



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

# Molekulare Grundlagen zur Diagnostik und Ätiologie genetisch bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen als Auslöser des plötzlichen Herztodes

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Nadine Kiehne

aus Frankfurt am Main

Berichterstatter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dietrich Mebs

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Galuske

Eingereicht am 18.04.2011

Mündliche Prüfung am 14.06.2011

Darmstadt 2011

D17

*„When the heart is diseased, its work is imperfectly performed: the vessels proceeding from the heart become inactive, so that you cannot feel them ... if the heart trembles, has little power and sinks, the disease is advanced and death is near.“*

*(Papyrus Ebers ca. 1500 v.Chr.)*

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der plötzliche Herztod .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Genetisch bedingte Herzerkrankungen .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Primär elektrische Herzerkrankungen .....	2
1.2.1.1 Ionenkanäle .....	3
1.2.1.2 Das Long QT Syndrom (LQTS).....	17
1.2.1.3 Das Short QT Syndrom (SQTS).....	20
1.2.1.4 Das Brugada Syndrom (BrS).....	21
1.2.1.5 Die Katecholaminerge, polymorph-ventrikuläre Tachykardie (CPVT) .....	22
1.2.2 Strukturelle Herzerkrankungen .....	24
1.2.2.1 Zell-Zell-Kontakte .....	24
1.2.2.2 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC).....	29
<b>1.3 Molekulare Autopsie .....</b>	<b>32</b>
<b>1.4 Ziel dieser Dissertation.....</b>	<b>34</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 DNA-Isolierung .....	35
2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	37
2.1.4 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) .....	38
2.1.5 Sequenzierung .....	38
2.1.6 TA Klonierung.....	39
2.1.7 QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenese.....	40
2.1.8 RNA Synthese .....	40
2.1.9 Elektrophysiologie an Oozyten.....	41
<b>2.2 Methoden .....</b>	<b>42</b>
2.2.1 DNA Isolierung .....	42
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	43
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese .....	54
2.2.4 Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) .....	56
2.2.5 Sequenzierung .....	59
2.2.5.1 Herstellung des Sequenzieransatzes:.....	59
2.2.5.2 Aufreinigung des Sequenzieransatzes.....	60
2.2.5.3 Vorbereitung der Sequenzierung .....	60
2.2.5.4 Sequenzanalyse .....	61

2.2.6	TA-Klonierung .....	62
2.2.6.1	Ligation .....	62
2.2.6.2	Transformation und Selektion .....	63
2.2.6.3	Isolation .....	65
2.2.7	QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenese.....	66
2.2.8	RNA Synthese .....	68
2.2.9	Elektrophysiologie an Oozyten.....	71
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1</b>	<b>Genetisches Screening bei Patienten und Verstorbenen .....</b>	<b>73</b>
<b>3.2</b>	<b>Patienten mit diagnostizierten Herzerkrankungen .....</b>	<b>73</b>
3.2.1	Untersuchung des <i>SCN5A</i> Gens .....	76
3.2.1.1	Mutation R1193Q .....	76
3.2.1.2	Mutation E1053K.....	79
3.2.1.3	Mutation A1186T .....	80
3.2.2	Untersuchung des <i>KCNQ1</i> Gens .....	84
3.2.2.1	Mutation R366Q .....	84
3.2.3	Untersuchung des <i>KCNH2</i> Gens .....	85
3.2.3.1	Mutation R1047L .....	86
3.2.3.2	Mutation L69P .....	87
3.2.3.3	Mutation R883W.....	89
3.2.4	Untersuchung des <i>RyR2</i> Gens .....	92
3.2.4.1	Mutation Y4944C.....	93
3.2.4.2	Mutation V4299M .....	94
3.2.4.3	Mutation R420Q .....	96
3.2.5	Untersuchung des <i>DSG2</i> Gens.....	98
3.2.6	Untersuchung des <i>PKP2</i> Gens .....	101
<b>3.3</b>	<b>Plötzliche Herztodesfälle .....</b>	<b>103</b>
3.3.1	<i>SCN5A</i> Mutationen I1768V und H558R.....	105
3.3.2	<i>KCNJ2</i> Mutation A371G .....	109
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>112</b>
<b>4.1</b>	<b>Zur Methodik.....</b>	<b>112</b>
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung von Patienten .....</b>	<b>113</b>
4.2.1	Patienten mit primär elektrischen Herzerkrankungen .....	113
4.2.1.1	Mutationen im <i>SCN5A</i> Gen .....	115
4.2.1.2	Mutationen im <i>KCNQ1</i> Gen.....	121
4.2.1.3	Mutationen im <i>KCNH2</i> Gen.....	122
4.2.1.4	Mutationen im <i>RyR2</i> Gen .....	128
4.2.2	Patienten mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie.....	134

4.2.2.1	Mutationen im <i>DSG2</i> Gen .....	135
4.2.2.2	Mutationen im <i>PKP2</i> Gen .....	137
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung von Personen mit ungeklärter Todesursache .....</b>	<b>141</b>
4.3.1	<i>SCN5A</i> Mutation I1768V .....	142
4.3.2	<i>KCNJ2</i> Mutation A371G .....	145
<b>4.4</b>	<b>Die Bedeutung der molekularen Autopsie.....</b>	<b>147</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>152</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>168</b>
7.1	Mutagenese Primer .....	168
7.2	Vektor pGEM®-T.....	168
7.3	Vektor pSP64 .....	169
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>170</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>172</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>174</b>
<b>11</b>	<b>EIGENE ARBEITEN .....</b>	<b>175</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Amp	Ampicillin
ARM	Armadillo-Motiv
ARVC/D	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie
BLAST	Basic Local Alignment Search
bp	Basenpaare
BrS	Brugada Syndrom
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre-DNA
CPVT	Katecholaminerge polymorph-ventrikuläre Tachykardie
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ddNTP	Di-Desoxyribonucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
hERG	human ether-a-go-go related gene
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICD	implantierbarer Cardioverter/Defibrillator
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
lacZ	$\beta$ -Galactosidase
LQTS	Long QT Syndrom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	National Center of Biotechnology
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCD	Sudden Cardiac Death (plötzlicher Herztod)
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome (plötzlicher Kindstod)
SQTS	Short QT Syndrom
UTR	untranslatierte Region
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## 1 Einleitung

### 1.1 Der plötzliche Herztod

Der plötzliche Herztod ist klinisch definiert als ein Tod, der bei zuvor gesund erscheinenden Personen innerhalb einer Stunde nach Beginn erster Symptome, zum Tod durch Kreislaufversagen führt (Kirchhof, 2003). Er stellt eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industriestaaten dar. Mehr als 300.000 Menschen sterben jährlich in Europa den plötzlichen Herztod (Kirchhof et al, 2006). Bei älteren Menschen sind in ca. 80 % der Fälle strukturelle Herzerkrankungen dafür verantwortlich, jedoch in 5 – 15 % trifft es junge, bisher asymptomatische Menschen. In den meisten Fällen lässt sich durch eine Obduktion die Todesursache klären. So findet man bei älteren Menschen als häufigste Ursache die koronare Arteriosklerose, gefolgt von kardialen Kardiomyopathien wie die dilatative Kardiomyopathie oder die hypertrophe Kardiomyopathie (Huikuri et al, 2001).

Bei jungen Menschen hingegen stellen die beiden zuletzt genannten Herzerkrankungen gemeinsam mit den arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathien die häufigste Todesursache dar. Aber auch angeborene Veränderungen der Koronararterien oder Myokarditis lassen sich des Öfteren bei < 35-Jährigen nachweisen (Ingles & Semsarian, 2007, Tester & Ackerman, 2006). Dennoch kann nicht immer durch eine Obduktion die Todesursache festgestellt werden. In 3 – 30 % der plötzlichen Herztodesfälle bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen, ist eine todesursächliche, morphologische Veränderung nicht feststellbar (Tester & Ackerman, 2006). In diesem Fall spricht man vom „Sudden Unexplained Death Syndrome“ (SUDS). Tritt der Tod aus ungeklärter Ursache innerhalb des ersten Lebensjahres auf, so bezeichnet man dies als „Sudden Infant Death Syndrome“ (SIDS). Vielen dieser autopsisch negativen Todesfälle liegt eine primäre elektrische Herzerkrankung zugrunde. Die Ursache einer solchen kardialen Erkrankung ist in Gendefekten spezifischer kardialer Proteine zu suchen, die bei einer Fehlfunktion zu Herzrhythmusstörungen und im schlimmsten Fall zum plötzlichen Herztod bei strukturell unauffälligem Herzen führen kann.

## **1.2 Genetisch bedingte Herzerkrankungen**

Beim plötzlichen Herztod handelt es sich um ein heterogenes Erscheinungsbild. So spielen viele verschiedene Faktoren eine Rolle, wie z.B. Lebensweise, Ernährung und die genetische Veranlagung. In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte zur Aufklärung der genetischen Grundlagen des plötzlichen Herztodes erzielt. So konnten bisher über 40 genetisch bedingte Herzerkrankungen identifiziert werden, wovon viele mit einem erhöhten Risiko für einen plötzlichen Herztod verbunden sind. Man unterteilt diese genetisch bedingten Herzerkrankungen in zwei Kategorien: zum einen in Erkrankungen mit strukturell verändertem Herz, wie z.B. die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), dilatative Kardiomyopathie (DCM) oder die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/Dysplasie (ARVC/D). Die zweite Kategorie beinhaltet die Erkrankungen mit strukturell unauffälligem Herzen, den sogenannten primär elektrischen Herzerkrankungen.

### **1.2.1 Primär elektrische Herzerkrankungen**

Unter primär elektrischen Herzerkrankungen versteht man Erkrankungen, bei denen das Herz strukturell unauffällig erscheint, aber auf zellulär-elektrophysiologischer Ebene Veränderungen auftreten (Schulze-Bahr, 2005). Diese Veränderungen lassen sich diagnostisch im EKG meist gut darstellen, und basieren in den meisten Fällen auf pathologischen Veränderungen kardialer Ionenkanäle. Man spricht in solchen Fällen auch von Ionenkanalerkrankungen. Dieser Begriff umfasst eine heterogene Gruppe von Erbkrankheiten, die klinisch durch vorübergehend auftretende Erregungsstörungen der Muskulatur oder des Nervensystems charakterisiert sind (Lerche H., 2000). Symptome wie Herzrhythmusstörungen, Muskelsteifigkeit, Lähmungen, Ataxien oder epileptische Anfälle treten häufig auf. Die Ursachen sind Mutationen in den Genen, welche gewebespezifische Ionenkanäle kodieren. Diese Mutationen können zu einer Veränderung in der Proteinstruktur des Kanals führen, so dass dieser seine spezifische Funktion nicht mehr erfüllen kann. Durch die Mutationen kann es entweder zu einem Funktionsverlust des Kanals kommen (loss-of-function), indem der Kanal nicht mehr öffnet, oder zu einer Dauererregung (gain-of-function), bei der der Kanal geöffnet

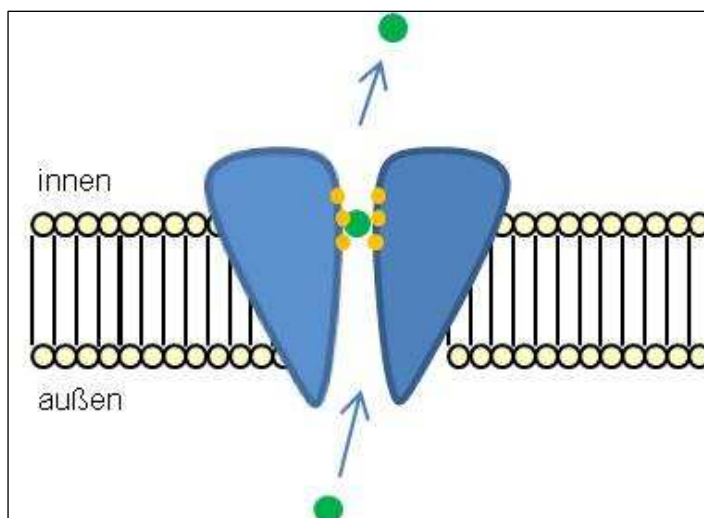


bleibt. Zurzeit sind Mutationen in über 60 Ionenkanal-Genen bekannt, welche in der Folge zu Krankheiten beim Menschen führen können (Ashcroft, 2006).

Im Fall der primär elektrischen Herzerkrankungen sind die kardialen Ionenkanäle und deren assoziierten Gene betroffen. Als Folge von Mutationen in den kardialen Ionenkanal-Genen kann es zu einer Fehlfunktion des Kanals kommen, woraus eine lebensgefährliche Herzrhythmusstörung resultieren kann. In den letzten Jahren wurden bedeutende Fortschritte bei der Aufklärung der genetischen Ursachen dieser Rhythmusstörungen erzielt. So konnten zahlreiche Gene von kardialen Ionenkanälen identifiziert und ihre Rolle bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen gesichert werden (Haverkamp et al, 2000; Priori et al, 1999; Roden et al, 1995).

### 1.2.1.1 Ionenkanäle

Als Ionenkanäle bezeichnet man eine Klasse von Proteinen, die spezifisch am Transport von anorganischen Ionen über die Zellmembran aller lebenden Zellen beteiligt sind. Sie bilden Poren, was die Passage von Ionen mit passender Größe und Ladung entlang eines elektrochemischen Gradienten ermöglicht. Ionenkanäle sind ionenselektiv und lassen nur spezifische anorganische Ionen den Kanal passieren (Hodgkin & Huxley, 1952).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Lokalisation eines Ionenkanals in der Plasmamembran.** Das Ion (grün) muss die Pore mit dem Selektivitätsfilter (gelb) passieren, um in die Zelle zu gelangen.

Ionenkanäle sind nicht ständig geöffnet, sondern wechseln zwischen einer geschlossenen und offenen Konformation. Diese Konformationsänderung wird durch verschiedene Reize bewirkt. Aufgrund dieser Reize werden die Ionenkanäle in drei Haupttypen unterteilt: mechanisch kontrollierte, ligandenkontrollierte und spannungskontrollierte Ionenkanäle. Generell spielen Ionenkanäle bei der elektrischen Erregbarkeit des Nervensystems eine entscheidende Rolle. Über Sinneszellen werden äußere Einflüsse in elektrische Potenziale umgewandelt, Ionenkanäle leiten diese Signale (Erregung) innerhalb des Körpers über Aktionspotenziale und synaptische Übertragung weiter. Am Effektororgan, wie z.B. Herz- oder Skelettmuskel, wird das elektrische Signal in eine mechanische Muskelkontraktion umgewandelt.

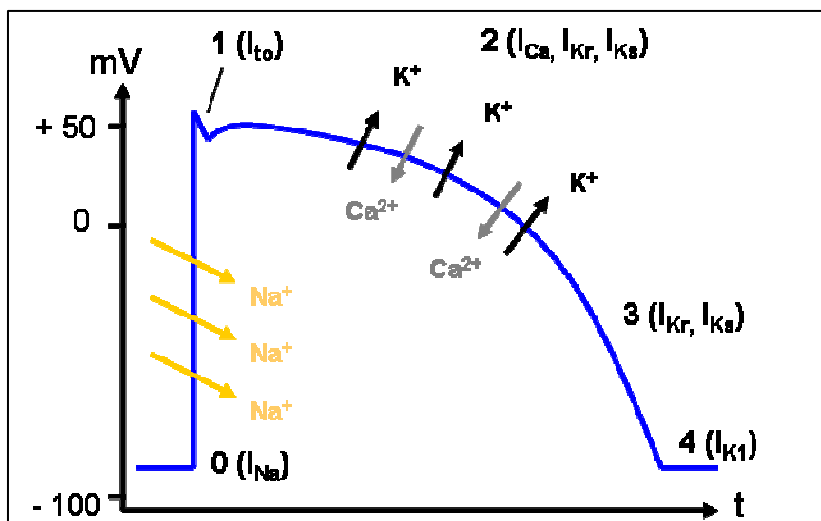
#### **1.2.1.1.1 Kardiale Ionenkanäle**

Die Aufgabe des Herzens besteht darin, mit jedem Herzschlag den gesamten Körper mit Blut zu versorgen. Jeder Herzschlag wird mit einem elektrischen Impuls eingeleitet, der von Schrittmacherzellen ausgeht und über die Herzzellen (Myozyten) in Form eines Aktionspotenzials weitergeleitet wird. Dieser Vorgang beruht auf einer präzisen und zeitlich optimalen Steuerung von Öffnen und Schließen der kardialen Ionenkanäle (Marbán, 2002).

##### Kardiales Aktionspotenzial

An Herzzellen herrscht eine negative Membranspannung, welche durch die hohe Leitfähigkeit der Membran gegenüber Kaliumionen (einwärts gerichteter  $I_{K1}$ -Strom) und gleichzeitig durch die geringe Leitfähigkeit für Natriumionen zustande kommt. Daher liegt das Membranpotenzial in der Nähe des Nernst'schen Gleichgewichtspotenzials für Kaliumionen von ca. -85 mV. Dieses Ruhepotenzial am Herzen ist jedoch nicht stabil. Es treten geringe Mengen  $Na^+$ -Ionen in das Zellinnere ein, wodurch die Spannung im Verlauf positiver wird bis das Schwellenpotenzial erreicht ist. Beim Erreichen des Schwellenpotenzials öffnen die spannungsabhängigen Natriumkanäle und depolarisieren die Membran (Phase 0). Während Phase 1 öffnen transiente Kaliumkanäle ( $I_{to}$ ), durch die schnell  $K^+$ -Ionen ausströmen können und die zunächst für eine schnelle Repolarisation sorgen. Die lange Phase 2 (Plateau-Phase) ist charakteristisch für das kardiale Aktionspotenzial

und kann bis zu 400 msec dauern. Hierbei öffnen verzögerte Kaliumkanäle (delayed-rectifier channels), sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Man unterscheidet bei den verzögerten Kaliumkanälen zwischen schnellen ( $I_{Kr}$ , r = rapid) und langsamen ( $I_{Ks}$ , s = slow)  $\text{K}^+$ -Kanälen. Während dieser Plateau-Phase herrscht ein Gleichgewicht zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ( $I_{Ca}$ ) und  $\text{K}^+$ -Ausstrom ( $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$ ). Ab einer Spannung von 0 mV, sind in Phase 3 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle inaktiviert und nur noch die verzögerten Kaliumkanäle ( $I_{Kr}$  und  $I_{Ks}$ ) geöffnet, was zur Repolarisation führt. In deren Verlauf nimmt die schnelle Komponente der verzögerten Kaliumkanäle ( $I_{Kr}$ ) stark zu, wodurch das Aktionspotenzial schnell abfällt. Dies ist der wichtigste Faktor bei der Repolarisation. In dieser Phase ist der absolute Ionenstrom relativ gering, so dass selbst kleine Abwandlungen der Einzelströme gravierende Folgen für die Dauer des Aktionspotenzials haben (Zitron et al, 2005). Die End-Repolarisation in Phase 4 erfolgt schnell und wird von einwärts gerichteten  $\text{K}^+$ -Kanälen ( $I_{K1}$ ) bestimmt (Roden et al, 2002) (Abb.1.2).

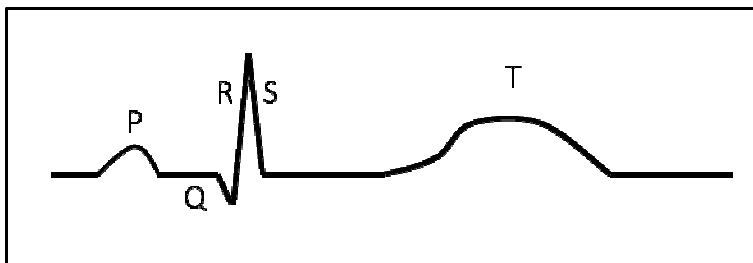


**Abb. 1.2: Das normale Aktionspotenzial einer Herzzelle.** Man unterteilt das kardiale Aktionspotenzial in 5 Phasen: Phase 0: schneller  $\text{Na}^+$  Einstrom in die Zelle, Phase 1: schnelles Ausströmen von  $\text{K}^+$  Ionen, Phase 2:  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom in die Zelle und verzögerter  $\text{K}^+$  Ausstrom, Phase 3: verzögerter  $\text{K}^+$  Ausstrom, Phase 4: End-Repolarisation durch einwärts gleichrichtende  $\text{K}^+$  Kanäle.

Das präzise Zusammenspiel dieser Ionenkanäle ist somit von größter Bedeutung für die Funktion des Herzens. Kommt es hierbei zu Fehlern, kann dies weit reichende Folgen für das kardiale Aktionspotenzial haben, was das Herz in seiner Funktion einschränkt und seine Arbeit daher nicht mehr optimal verrichten kann.

### Das Elektrokardiogramm (EKG)

Den Erregungsablauf am Herzen kann man mittels eines Elektrokardiogramm (EKG) messen. Hierbei werden die Potenziale der Muskelfasern von dem umgebenen Gewebe fast unverändert weitergeleitet. Das 12-Kanal-EKG zeichnet 12 Ableitungen auf. Dazu gehören die drei bipolaren (zwei Elektroden) Extremitätenableitungen nach Einthoven, drei unipolaren (eine Elektrode) Extremitätenableitungen nach Goldberger, sowie die sechs unipolaren Brustwandableitungen nach Wilson. Diese verschiedenen Ableitungen ermöglichen die Aufzeichnung der Potenziale von den in Richtung der Ableitung liegenden Herzabschnitten.



**Abb.1.3.:Schematische Darstellung eines normalen EKGs.**

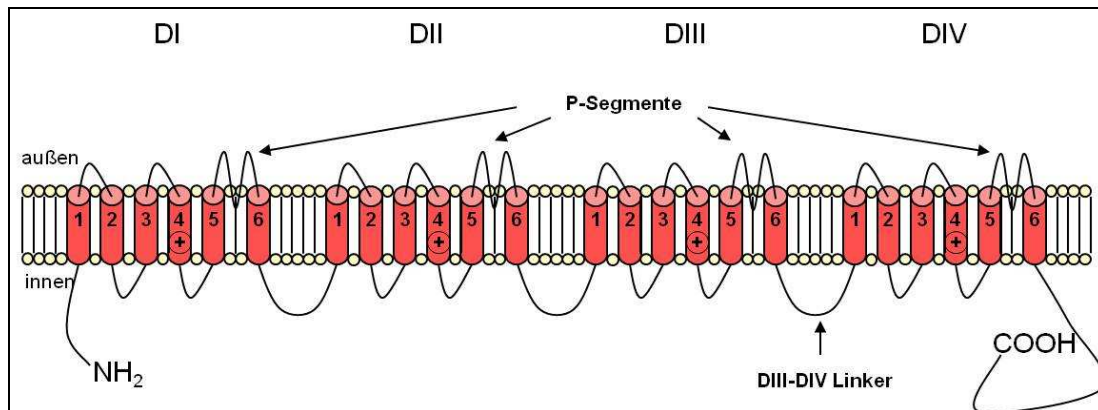
Der Kurvenverlauf des EKGs setzt sich aus dem Vorhofanteil und dem Kammerkomplex zusammen. Die Zacken sind nach Einthoven (P, Q, R, S und T) benannt. Die P-Welle wird durch die Vorhofdepolarisation erzeugt, der QRS-Komplex stellt die Ventrikeldepolarisation und Vorhofrepolarisation dar, und die T-Welle wird von der Ventrikelrepolarisation generiert (Abb.1.3).

#### **1.2.1.1.2 Kardialer Natriumkanal $\text{Na}_v1.5$**

Hodgkin und Huxley (1952) konnten elektrophysiologisch zum ersten Mal Natriumströme aufzeichnen. Zudem definierten sie die drei Hauptcharakteristika der Natriumkanäle: die spannungsabhängige Aktivierung, die schnelle Inaktivierung und die Ionenselektivität der Kanäle. 1984 gelang es zum ersten Mal die cDNA des Kanalproteins des Zitteraals zu isolieren und dadurch einen Einblick in die Struktur des Natriumkanals zu gewinnen (Noda et al, 1984).

Die  $\alpha$ -Untereinheit eines jeden Natriumkanals besteht generell aus vier homologen Domänen (DI-DIV), die wiederum jeweils aus sechs identischen,  $\alpha$ -helikalen

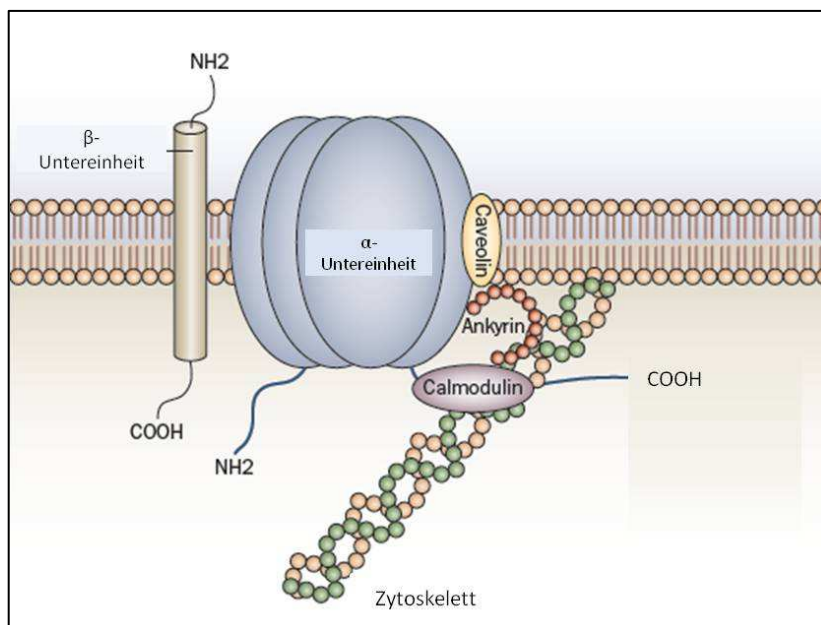
Transmembransegmenten (S1 – S6) aufgebaut sind. Zwischen den Segmenten S5 und S6 befinden sich extrazelluläre Schleifen (P-Segmente), die die Pore mit dem Selektivitätsfilter bilden (Abb.1.4). Mit Hilfe von Tetrodotoxin und Saxitoxin, die als spezifische Na<sup>+</sup>-Kanal Blocker fungieren, konnte die Pore mit dem Selektivitätsfilter und dessen Signatursequenz DEKA identifiziert werden (Pérez-García et al, 1996).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des kardialen spannungsabhängigen Natriumkanals Na<sub>v</sub>1.5.** Er besitzt vier homologe Domänen (DI – DIV). Die P-Segmente bilden gemeinsam die Pore. Segment 4 ist positiv geladen und dient als Spannungssensor.

Die spannungsabhängige Aktivierung der Natriumkanäle beruht auf plötzlichen Spannungsunterschieden in der Membran (Armstrong, 1981). Das Transmembransegment S4 besitzt positive Ladungen und dient als Spannungssensor (Stühmer et al, 1989). Während des Ruhepotenzials herrscht eine Spannung von -85 mV, so dass das positiv geladene Segment S4 zur Innenseite der Membran gezogen wird. Wenn sich bei einem Reiz die Spannung an der Membran ändert, hat dies zur Folge, dass sich das S4 Segment nach außen verlagert und seine Konformation so verändert, dass die Pore geöffnet wird (Yang & Horn, 1995). Kurz darauf initiiert diese Konformationsänderung die schnelle Inaktivierung des Kanals. Dies ist ein weiteres Charakteristikum der Natriumkanäle, bei dem der DIII-DIV Linker eine große Rolle spielt. Ähnlich eines Stopfens schiebt er sich intrazellulär vor den Porenausgang und blockiert den weiteren Na<sup>+</sup>-Einstrom (Armstrong & Bezanilla, 1977). Er besitzt ein IFM-Motiv, welches intrazellulär an die Pore bindet und diese schnell verschließt (West et al, 1992; Kellenberger et al, 1996). Hierbei handelt es sich um die N-Typ-Inaktivierung, die allerdings nicht sehr stabil ist. Eine stabilere aber langsamere Form stellt die C-Typ-Inaktivierung dar, bei

der Cysteine in der äußeren Pore Disulfidbrücken ausbilden und die Pore geschlossen halten (Balser et al, 1996; Vilin et al, 1999). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich des Proteins ebenfalls an der Inaktivierung beteiligt ist und mit dem DIII-DIV Linker interagiert (Kass, 2006). Neben der beschriebenen  $\alpha$ -Untereinheit ist eine weitere, regulatorische  $\beta$ -Untereinheit aktiv. Sie besteht aus nur einer Transmembrandomäne und wirkt mit Domäne DI und DIV zusammen. Sie ist nicht an dem Porenkomplex beteiligt, dennoch bewirkt die Koexpression dieser  $\beta$ -Untereinheit eine bessere und stärkere Aktivierung und Inaktivierung des Natriumkanals (Ruan et al, 2009).



**Abb 1.5: Schematische Darstellung des Natriumkanal-Komplexes in der Membran.** Dargestellt sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, ebenso die Proteine, die für die Verankerung in der Membran und am Zytoskelett sorgen. Hierzu zählen Caveolin und Ankyrin. Calmodulin reagiert auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen (verändert nach Ruan et al, 2009).

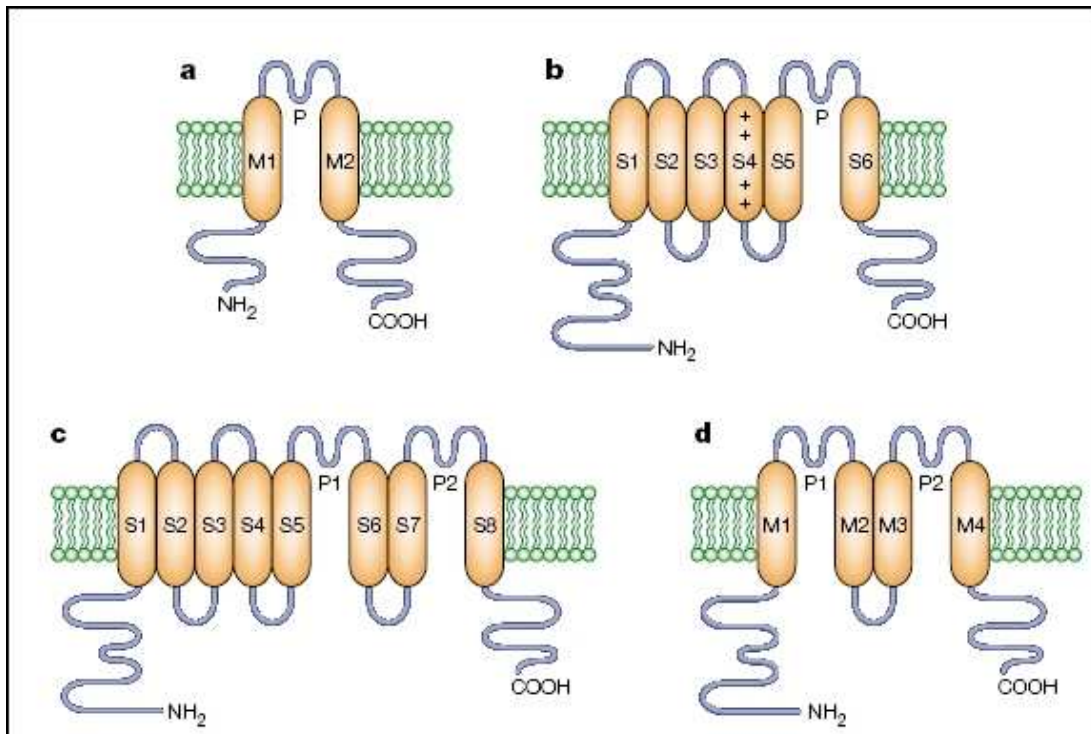
Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms wurden insgesamt 11 Gene entdeckt, die homologe  $\alpha$ -Untereinheiten der  $\text{Na}^+$ -Kanäle kodieren (Venter et al, 2001). Das Gen *SCN5A* befindet sich auf Chromosom 3p21 (George et al, 1995) und codiert die  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Natriumkanals  $\text{Na}_v1.5$  am Herzen. Das Protein umfasst 2016 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 227 kDa (Gellens et al, 1992). 1996 gelang es erstmals die genomische Struktur

von *SCN5A* zu entschlüsseln. Es handelt sich um ein 80 kb langes Gen, bestehend aus 28 Exons (Wang et al, 1996).

Der durch das Gen *SCN5A* codierte Natriumkanal  $\text{Na}_v1.5$  besitzt vier homologen Domänen (DI – DIV), welche aus je sechs Transmembransegmenten bestehen. N-Terminus und C-Terminus befinden sich intrazellulär, ebenso der DIII – DIV Linker. Der C-Terminus besitzt ein QT-Motiv, mit dem der Kanal auf intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen reagieren kann (Mori et al, 2000). Das QT-Motiv ist eine Bindungsstelle für das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Calmodulin (Abb 1.5). 2002 konnte gezeigt werden, dass die langsame Inaktivierung von  $\text{Na}_v1.5$  von der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration abhängig ist (Tan et al, 2002).  $\text{Na}_v1.5$  kann durch die Proteinkinase A phosphoryliert und aktiviert werden. Im DI-DII Linker befinden sich hierfür mögliche Bindungsstellen (Grant, 2001).

#### **1.2.1.1.3 Die kardialen Kaliumkanäle hERG, $\text{K}_v7.1$ und Kir2.1**

Die Familie der Kaliumkanäle umfasst die größte Gruppe der Ionenkanäle. Man teilt sie aufgrund ihres Aufbaus in vier Hauptklassen ein (Abb.1.6.): die erste Klasse besteht aus zwei Transmembrandomänen und einer Porenregion. Hierzu gehören die Gleichrichter-Kaliumkanäle (inward rectifier channels). Sie sind spannungsunabhängig und leiten  $\text{K}^+$ -Ionen in nur eine Richtung, was für die Aufrechterhaltung des Ruhepotenzials entscheidend ist (Karschin & Karschin, 1997). Klasse zwei besteht aus sechs Transmembrandomänen und einer Porenregion. Sie sind spannungsabhängig und werden häufig mit einer  $\beta$ -Untereinheit coexprimiert. Aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten kommt es zu einer hohen Variabilität dieser  $\text{K}^+$ -Kanäle (Shieh et al, 2000). Hierzu zählen spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle des delayed rectifier und transient Typs in elektrisch erregbaren Zellen, wie z.B.: Neurone und Muskelzellen. Die dritte Klasse konnte als erstes bei Hefen identifiziert werden und besteht aus 8 Transmembrandomänen und zwei Porenregionen. Sie lagern sich als Dimere zusammen, um einen funktionsfähigen Kanal zu bilden (Choe, 2002). Klasse vier weist vier Transmembrandomänen und zwei Porenregionen auf. Zur Ausbildung der Pore lagern sie sich zu Dimeren zusammen (Biggin et al, 2000). Diese Kanäle wurden erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Choe, 2002).



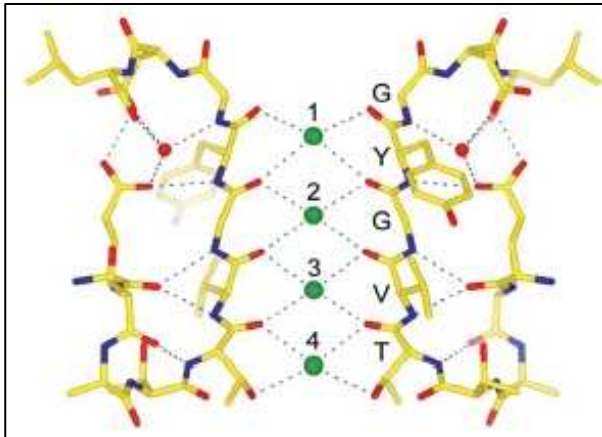
**Abb.: 1.6.: Übersicht der vier Klassen der K<sup>+</sup> Ionenkanäle.** a) Klasse eins besteht aus zwei Transmembrandomänen und einer Porenregion; b) Klasse zwei setzt sich aus sechs Transmembrandomänen und einer Porenregion zusammen; c) Klasse drei besteht aus acht Transmembrandomänen und zwei Porenregionen; d) Klasse vier besitzt ebenfalls zwei Porenregionen und vier Transmembrandomänen (Choe, 2002).

Mittels Röntgenkristallographie konnte die Struktur des bakteriellen K<sup>+</sup>-Kanals (KcsA) von *Streptomyces lividans* erstmals aufgeklärt werden (Doyle et al, 1998). Hierbei zeigte es sich, dass dieser Kanal aus vier identischen Transmembran-Untereinheiten besteht, die zusammen eine zentrale Pore durch die Membran bilden. Am cytoplasmatischen Eingang der Pore befinden sich negativ geladene Aminosäuren, die den Kanal kationenselektiv machen. Je zwei Transmembranhelices einer Untereinheit bilden zusammen einen Trichter aus, in dem sich der Selektivitätsfilter befindet. Dieser Filter formt eine starre und enge Pore, die von Carbonylsauerstoffatomen ausgekleidet ist. An dieser Stelle muss das Ion seine Hydrathülle abstreifen und mit den Carbonylsauerstoffatomen interagieren, um den Kanal passieren zu können (Abb 1.7).

Die  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals besteht aus sechs Transmembranhelices. Transmembransegment 4 stellt den Spannungssensor dar. Er besitzt an jeder dritten Position positiv geladene Aminosäurereste (Yellen et al, 1991). Im Ruhepotenzial ist er nach innen gerichtet, während er sich bei einer



Depolarisation nach außen verschiebt und somit den Kaliumausstrom ermöglicht (Armstrong & Bezanilla, 1974).



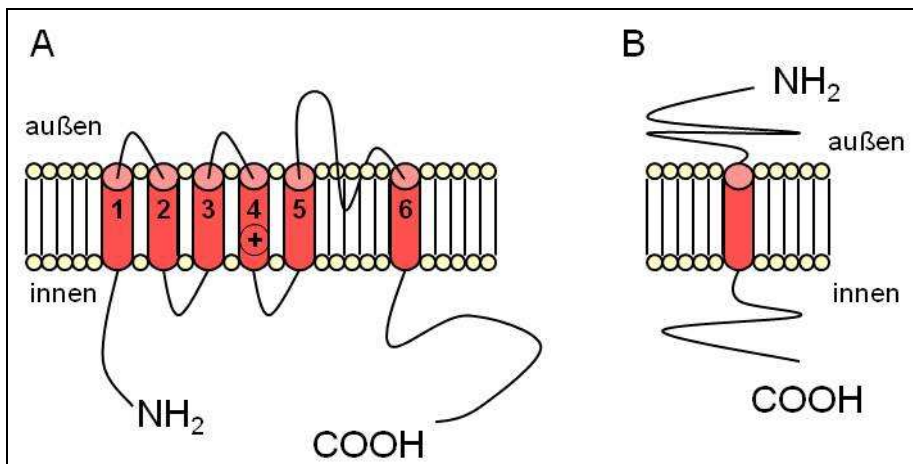
**Abb. 1.7: Darstellung des Selektivitätsfilters von KcsA.** Die dehydrierten Kaliumionen (grün) treten nach Abstreifen der Hydrathülle mit den Carbonylsauerstoffatomen in Wechselwirkung. Rot: Sauerstoff-Atome, gelb: Kohlenstoffe, blau: Stickstoff-Atome. GYGVT ist die Signatursequenz des  $K^+$ -Kanals. Die Kaliumionen sind in vier Positionen (1-4) dargestellt (MacKinnon, 2004).

Die Transmembransegmente S5 und S6 bilden im Tetramer die Pore mit dem Selektivitätsfilter und dessen Signatursequenz TVGYG (Abb. 1.7). Nach der Aktivierung folgt die Inaktivierung des Kanals, indem zunächst der N-Terminus des Proteins an der intrazellulären Seite der Pore bindet und diese verschließt (Rasmusson et al, 1998). Dieser Vorgang geschieht schnell nach Aktivierung des Kanals und wird N-Typ-Inaktivierung genannt. Im Anschluss daran folgt eine zweite Variante der Inaktivierung, bei der nicht der N-Terminus, sondern die Pore beteiligt ist. In der Porenregion befinden sich Cystein-Seitenketten, die bei einer räumlichen Zusammenlagerung Disulfidbrücken ausbilden und die Pore fest verschließen (C-Typ-Inaktivierung). Diese Konformationsänderung, die für die Annäherung der Cysteine verantwortlich ist, ist spannungsabhängig. Während der Repolarisation verlagert sich der Spannungssensor wieder nach innen, was die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht (Rasmusson et al, 1995). Neben der  $\alpha$ -Untereinheit der spannungsabhängigen Kaliumkanäle wird noch eine regulatorische  $\beta$ -Untereinheit koexprimiert. Diese wirkt modifizierend auf die Funktion der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit.

Das menschliche *KCNH2* Gen codiert die  $\alpha$ -Untereinheit hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) des spannungsabhängigen Kaliumkanals ( $I_{Kr}$ ) und wird hauptsächlich im Herzen exprimiert (Curran et al, 1995). Gemeinsam mit der  $\beta$ -Untereinheit MiRP1 bildet hERG zusammen den Kanalkomplex. *KCNH2* ist auf Chromosom 7q25-q36 lokalisiert, besteht aus 16 Exons und hat eine Größe von 55

kb (Splawski et al, 1998). hERG ist für die schnelle Komponente ( $I_{Kr}$ ) des verzögerten Kaliumkanals während Phase 3 im kardialen Aktionspotenzial verantwortlich.

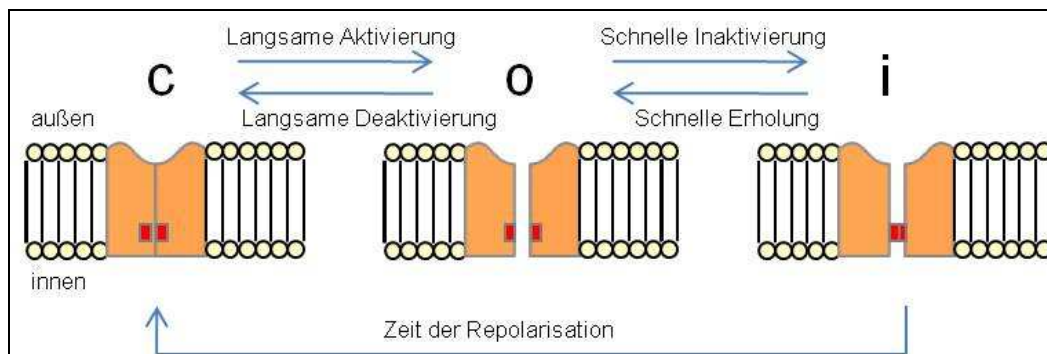
Die Struktur von hERG ist der anderer spannungsabhängiger  $K^+$ -Kanälen sehr ähnlich (Roden & George, 1997). Eine Untereinheit besteht aus sechs  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten, wovon Segment S5 und S6 im Tetramer die Pore bilden. Segment S4 stellt mit seinen positiven Ladungen den Spannungssensor, der für die schnelle Aktivierung des Kanals verantwortlich ist (Abb. 1.8). Zudem wurde gezeigt, dass hERG zusätzlich über das  $\beta$ -adrenerge System aktiviert wird (Kagan et al, 2002). Hierbei spielen zwei Signalwege eine Rolle: zum einen besitzt hERG eine Proteinkinase A Bindungsstelle, die es dem Enzym ermöglicht, an den Kanal zu binden und ihn zu phosphorylieren (Thomas et al, 1999), zum anderen verfügt hERG auch über eine cAMP Bindungsstelle, durch die der Kanal direkt über cAMP aktiviert wird (Cui et al, 2000). Diese beiden Signalwege sind wichtig für Stresssituationen im Körper, bei denen der Blutdruck, z.B. über Adrenalin und Kortisol, schnell erhöht werden muss.



**Abb. 1.8: Schematische Darstellung des hERG Kanals.** A:  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals. Vier Untereinheiten bilden gemeinsam ein Tetramer. B:  $\beta$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals. Diese wirkt modifizierend auf die  $\alpha$ -Untereinheit.

Charakterisiert ist hERG durch seine sehr schnelle Inaktivierung und seine langsame Deaktivierung. Die schnelle Inaktivierung vermittelt, dass der Kanal nicht weiter erregbar ist, während die langsame Deaktivierung die Zeit beschreibt, in der der Kanal in die geschlossene Konformation übergeht. Diese langsame

Deaktivierung ist entscheidend für die Länge des kardialen Aktionspotenzials (Schönherr & Heinemann, 1996) und wird dadurch charakterisiert, dass der Kanal vom inaktivierten Zustand über Durchlaufen des offenen Zustandes in die geschlossene Konformation übergeht (Abb. 1.9).

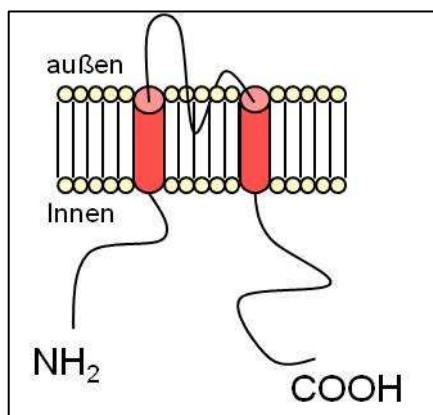


**Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Konformationszustände des hERG Kanals.** Es existieren drei Konformationen: C = geschlossen, O = offen, I = inaktiviert. Durch Depolarisation der Membran wird hERG langsam aktiviert und sehr schnell inaktiviert. Infolge der Repolarisation kommt es zu einer schnellen Erholung der Kanäle von der Inaktivierung und zur anschließenden langsamen Deaktivierung.

Im intrazellulären N-Terminus des Proteins befindet sich ein Bereich von ca. 100 - 130 Aminosäuren, der innerhalb der ERG-Familie charakteristisch ist. Durch Analyse der 3D-Struktur des N-Terminus, konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine PAS-Domäne handelt. Die Abkürzung PAS steht für die Genprodukte *Per*, *Arnt* und *Sim*. Die PAS-Domäne wurde zunächst mit der circadianen Rhythmik (Tag-Nacht-Rhythmus) in Verbindung gebracht, sie spielt aber auch bei anderen Prozessen eine regulatorische Rolle (Morais Cabral et al, 1998; Pandini & Bonati, 2005). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die PAS-Domäne an der langsamen Deaktivierung mitwirkt. Befinden sich Mutationen in diesem Bereich (Aminosäuren 29 – 86), so wirken diese beschleunigend auf die Deaktivierung (Chen et al, 1999). In einer weiteren Studie konnte mittels Mutationsanalyse nachgewiesen werden, dass der Kanal nicht in der Zellmembran eingebaut wird und dies zu einem verlängertem kardialen Aktionspotenzial führt (Paulussen et al, 2002).

1996 wurde ein weiteres kardiales Kaliumkanalgen, welches die  $\alpha$ -Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_v7.1$  codiert, entdeckt (Wang et al, 1996). Dieses Gen (*KCNQ1*) befindet sich auf Chromosom 11p15.5, besteht aus 16 Exons und hat eine Größe von 400 kb.  $K_v7.1$  wird überwiegend im Herzmuskel exprimiert. Aber auch in Zellen des Innenohrs, des Pankreas, des Darms und der Niere kommt es zur Expression von  $K_v7.1$ . Wie auch der hERG Kanal, besteht der  $K_v7.1$  Kanal aus 6  $\alpha$ -helikalen Transmembransegmenten, von denen die Segmente S5 und S6 im Tetramer die Pore bilden. Den Spannungssensor stellt das Segment S4 dar. Im Herzen bildet die  $\alpha$ -Untereinheit zusammen mit der MinK  $\beta$ -Untereinheit den Kanalkomplex ( $IK_s$ ), der als langsame Komponente des verzögerten Kaliumkanals für die Repolarisierung des Herzaktionspotenzials in Phase 3 des kardialen Aktionspotenzials von großer Bedeutung ist (Wulff et al, 2009).

*KCNJ2* codiert den einwärts gleichgerichteten Kaliumkanal Kir2.1 und wurde erstmals 1994 isoliert (Raab-Graham et al, 1994). Das Gen befindet sich auf Chromosom 17q23.1-q24.2. Das Protein besteht aus 427 Aminosäuren, besitzt 2 Transmembrandomänen (Abb. 1.10) und wird sowohl im Skelettmuskel, als auch im Herzmuskel exprimiert (Kubo et al, 1993). Dieser einwärts gleichgerichtete Kaliumkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Ruhepotenzials, indem er den Einstrom von  $K^+$ -Ionen gewährleistet, aber auch einen kleinen Auswärtsstrom über die Membran zulässt (Kubo et al, 1993). Er stellt somit das Membranpotenzial in Nähe des Nernst'schen Gleichgewichtspotenzial von -85 mV sicher (Zitron et al, 2005). Neben der Aufrechterhaltung des Ruhepotenzials sind  $I_{K1}$ -Kanäle an der End-Repolarisation des Aktionspotenzials beteiligt, indem sie die Membran ins das Ruhepotenzial zurückführen und deren Stabilisierung bis zum nächsten elektrischen Signal gewährleisten (Lopatin & Nichols, 2001).



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung des kardialen Kir2.1 Kanals.** Er ist durch seine zwei Transmembrandomänen und einer Porenregion charakterisiert.

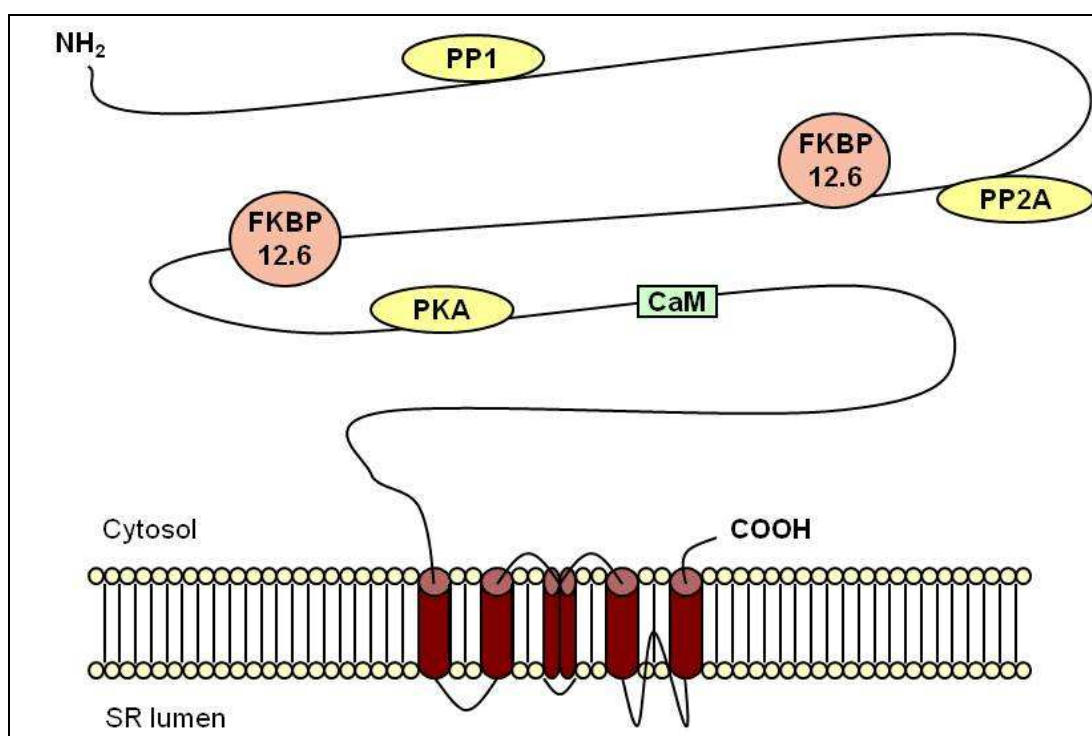
Kir2.1 gehört zur ersten Klasse der vier Hauptklassen von Kaliumkanälen. Wie bei allen Kaliumkanälen besitzt er innerhalb der Porenregion eine spezielle Signatursequenz (G-Y/F-G), die den selektiven Kaliumfluss über die Membran ermöglicht (Lopatin & Nichols, 2001). Eine negative Ladung an Position E138, sowie eine positive Ladung an Position R148 sorgen für die Stabilität des Selektivitätsfilters. Sowohl N-Terminus als auch C-Terminus des Proteins befinden sich im Cytoplasma.

#### **1.2.1.1.4 Der kardiale Calciumkanal: Der Ryanodin Rezeptor**

Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt in vielen biologischen Prozessen eine essentielle Rolle. Oozytenfertilisation, Hormonsekretion, apoptotische Prozesse, sowie die Muskelkontraktion werden durch die Veränderung von intrazellulärem Calcium reguliert. Als  $\text{Ca}^{2+}$  Speichermedium dient das endoplasmatische Retikulum (ER), am Herzen spricht man vom sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Bisher sind zwei Kanalgruppen, die intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  freisetzen, bekannt: Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptoren (IP3R) und Ryanodin Rezeptoren (RyR) (Ogawa, 1994). In vielen Zellen treten die IP3- und Ryanodin Rezeptoren gleichzeitig auf und werden über unterschiedliche Signalwege aktiviert. Die Ryanodin Rezeptoren haben ihren Namen während der Charakterisierung dieser Calciumkanäle erhalten, da man feststellte, dass sie spezifisch das Pflanzenalkaloid Ryanodin binden (Zucchi & Ronca-Testoni, 1997). Es sind insgesamt drei Isoformen dieser Rezeptoren bekannt, die in den Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden. Im Skelettmuskel ist vor allem RyR1 zu finden (Takeshima et al, 1989), im Herzmuskel ist die dominierende Form der Ryanodin Rezeptor Typ 2 (RyR2) (Yamazawa et al, 1996). RyR3 wird in verschiedenen Regionen des Gehirns, wie zum Beispiel im Hippocampus und im Corpus striatum sowie in der Skelettmuskulatur und in Zellen des Immunsystems exprimiert (Giannini et al, 1995).

Der kardiale Ryanodin Rezeptor (RyR2) ist ein liganden-gesteuerter Ionenkanal, der durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wird. Er ist der wichtigste  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzende Kanal im sarkoplasmatischen Retikulum. RyR2 ist ein Tetramer, zusammengesetzt aus vier Polypeptiden und besteht zu 80 % aus der so genannten Fußstruktur, die im Cytoplasma liegt. Dort befinden sich spezifische Bindungsdomänen für die Proteinkinase A (PKA) und die Phosphatasen 1 und 2A, welche über

Adapterproteine am Rezeptor binden. Darüber hinaus findet man in der Fußstruktur die Bindungsdomänen für Calmodulin und FK506-Bindeprotein (FKBP12.6). Die Transmembrandomäne macht die restlichen 20 % des Proteins aus, welche aus sechs Transmembransegmenten und einer Porenregion aufgebaut ist (Yano et al, 2006) (Abb. 1.11). Das den Rezeptor kodierende Gen *RyR2* gehört zu den größten und komplexesten des menschlichen Genoms. Es setzt sich aus 105 Exons zusammen und hat eine Größe von > 800 kb (George et al, 2007). Lokalisiert ist das Gen auf dem Chromosom 1, Locus q42.1-q43.



**Abb 1.11: Schematische Darstellung des Ryanodin Rezeptors.** Dargestellt sind die Bindestellen der akzessorischen Proteine PP1: Phosphatase 1, PP2A: Phosphatase 2A, PKA: Proteinkinase A, CaM: Calmodulin, FKBP12.6: FK506-Bindeprotein. SR: Sarkoplasmatisches Retikulum.

Die Herzmuskelkontraktion wird durch einen intrazellulären Calciumanstieg initiiert. Hierbei spielen zwei Calciumquellen eine Rolle. Zunächst wird während der Depolarisation des kardialen Aktionspotenzials Calcium über die membranständigen, spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle in die Zelle transportiert.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet am calciumsensitiven Ryanodin Rezeptor RyR2, woraufhin

sich dieser öffnet und das sarkoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle entlässt (CICR – calcium induced calcium release) (Wehrens et al, 2003). Der daraus resultierende intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert die Myofilamente zur Kontraktion.

Der präzise Ablauf des Öffnens und Schließens des Ryanodin Rezeptors wird durch verschiedene physiologische Effektoren, die an den Kanal binden, gesteuert. Zu diesen gehören z.B.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, sowie ein Netzwerk von akzessorischen Proteinen. Dazu zählen das FKBP12.6, die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA), die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII), eine Proteinphosphatase, sowie Calsequestrin (CASQ2) (Meissner, 2004).

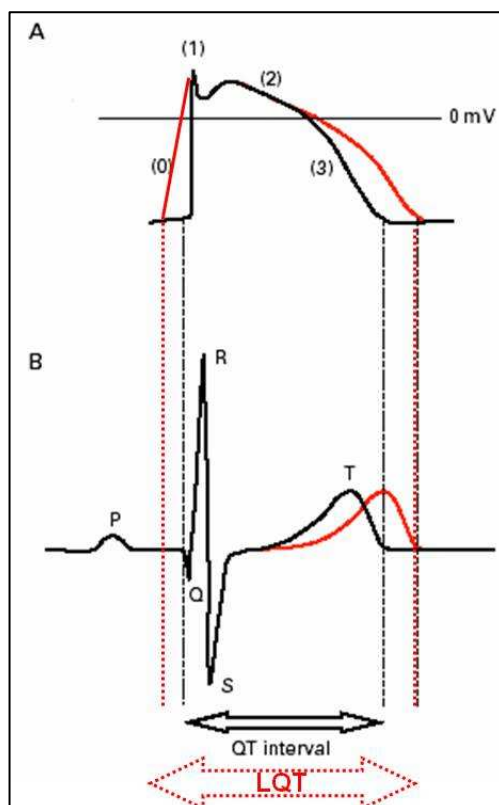
Unter Stress oder beim Sport wird das sympathische Nervensystem stimuliert, was zu einer catecholaminergen Aktivierung führt. Zu den catecholaminergen Substanzen gehören z.B. Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin, welche an adrenergen Rezeptoren (AR) binden, die über ein G-Protein stimuliert werden und zu einer intrazellulären cAMP Erhöhung führen. cAMP aktiviert in der Zelle die Proteinkinase A, was im aktivierten Zustand zur Dissoziation des FKBP12.6 vom RyR2 Komplex führt und somit die Empfindlichkeit des Kanalkomplexes gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht (Wehrens et al, 2003, Marx et al, 2000, Phrommintikul & Chattipakorn, 2006).

### **1.2.1.2 Das Long QT Syndrom (LQTS)**

Das kongentiale Long QT Syndrom (LQTS) ist eine genetisch heterogene Ionenkanalerkrankung, die lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen zur Folge hat. Durch Mutationen in den kardialen Ionenkanal-Genen kann es zu einer Verlängerung der QT-Zeit im 12-Kanal-EKG kommen. Die QT-Zeit bezeichnet die gesamte intraventrikuläre Erregungsdauer und wird bei Männern ab einem Wert von > 440 ms und bei Frauen ab einem Wert von > 460 ms als verlängert angesehen (Schimpf et al, 2009). Dennoch kann man bei 36 % der LQTS-Patienten keine QT-Zeit Verlängerung im EKG feststellen. Die Häufigkeit dieser Erkrankung wird auf 1:5.000 – 1:10.000 (USA) und die darauf zurück zu führenden Todesfälle auf 3.000-4.000 pro Jahr geschätzt (Locati et al, 1998). Physiologisch liegt der veränderten QT-Zeit eine Verlängerung des kardialen Aktionspotenzials zugrunde (El-Sherif & Turitto, 2003; January et al, 2000). Der Grund hierfür ist hauptsächlich in der

Funktionsreduktion („Loss-of-function“) der repolarisierenden Kaliumkanäle in Phase 2 und 3 des Aktionspotenzials zu suchen (Abb. 1.12). Seltener kommt es zu einer funktionellen Zunahme („gain-of-function“) der depolarisierenden Natrium- oder Calciumströme (Roden et al, 2002).

In den letzten Jahren konnten viele kardiale Ionenkanal-Gene identifiziert und ihre Rolle bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen gesichert werden (Haverkamp et al, 2000; Priori et al, 1999; Roden et al, 1995) (Tab. 1.1).



**Abb. 1.12: Darstellung des kardialen Aktionspotenzials und die Auswirkung auf das QT-Intervall im EKG.** A) Kardiales Aktionspotenzial. Schwarz: beim gesunden Menschen, rot: verlängertes Aktionspotenzial. Beteiligte Ionenkanäle: (0):  $I_{Na}$ , (1):  $I_{to}$ , (2):  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Ca}$ , (3):  $I_{Kr}$  B) Oberflächen EKG. Schwarz: gesunder Mensch, rot: verlängertes QT-Intervall (Verändert nach Abriel et al, 2004).

Inzwischen sind über 200 Mutationen in verschiedenen Genen identifiziert worden, deren Mutationen zu den LQT-Syndromen 1-12 führen können (Modell & Lehmann, 2006): hierbei handelt es sich zum einen um Gene, die kardiale Kaliumkanäle, deren  $\beta$ -Untereinheiten und Ankerproteine codieren: *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *ANK2* und *AKAP9* (Curran et al, 1995; Wang et al, 1996; Abbott et al, 1999; Schulze-Bahr et al, 1997b; Tristani-Firouzi et al, 2002; Mohler et al, 2003; Chen & Priori, 2008), und zum anderen um Gene, die den kardialen Natriumkanal *SCN5A* (Wang et al, 1995) und dessen  $\beta$ -Untereinheit *SCN4B* (Medeiros-Domingo et al, 2007), sowie das Adapter Protein *CAV3* (Vatta et al, 2006) und *SNTA1* (Ueda



et al, 2008) codieren. Weiterhin wurden Mutationen im Calciumkanal-Gen, *CACNA1C*, entdeckt, die ebenfalls zu einer verlängerten QT-Zeit im EKG führen (Splawski et al, 2005). Bei den LQTS 10-12 handelt es sich um Einzelfälle, die im Gesamtbild nur zu < 0,1 % auftreten (Hedley et al, 2009).

Typ	Gen	Protein	Chromosomaler Locus	Häufigkeit in %
LQTS 1	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	11p15.5	30-35
LQTS 2	<i>KCNH2</i>	hERG	7q35-q36	25-30
LQTS 3	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	3p21	5-10
LQTS 4	<i>ANK2</i>	Ankyrin-2	4q25-q27	< 1
LQTS 5	<i>KCNE1</i>	MinK	21q22.1	< 1
LQTS 6	<i>KCNE2</i>	MiRP1	21q22.1	< 1
LQTS 7	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	17q23	< 1
LQTS 8	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	12p13.3	< 1
LQTS 9	<i>CAV3</i>	Caveolin-3	3p25	< 1
LQTS 10	<i>SCN4B</i>	Navβ4	11q23.3	< 1
LQTS 11	<i>AKAP9</i>	AKAP9/yotiao	7q21-q22	< 1
LQTS 12	<i>SNTA1</i>	α-syntrophin	20q11.2	< 1

**Tabelle 1.1: Übersicht der verschiedenen Long-QT-Syndrome.** Die Häufigkeiten sind in Prozent dargestellt und beziehen sich auf die Verteilung innerhalb des Krankheitsbildes des Long QT Syndroms (verändert nach Hedley et al, 2009).

Man unterscheidet zwischen der angeborenen und der erworbenen Form des Long-QT-Syndroms. Die erworbene Form kann durch Einnahme von bestimmten Medikamenten, wie z.B. Psychopharmaka (Lithium, Haloperidol), Antibiotika (Chinin, Erythromycin), Antihistaminika oder Antiarrhythmika ausgelöst werden (Haverkamp et al, 1994; Haverkamp et al, 2000). Hierbei handelt es sich nicht um vorhersehbare Medikamentennebenwirkungen, sondern um eine individuelle Reaktion auf diese Substanzen.

Bei der angeborenen Form des Long-QT-Syndroms unterscheidet man zwischen der häufiger auftretenden autosomal-dominant vererbten Romano-Ward-Form (ROMANO et al, 1963; WARD, 1964) und der selteneren autosomal-rezessiv vererbten Jervell-Lange-Nielsen-Form, die mit angeborener Taubheit einhergeht (Schulze-Bahr et al, 1997a; Schwartz et al, 2006). Der Zeitpunkt der

Erstsymptomatik variiert. So sind intrauterine Fälle beschrieben (Ohkuchi *et al.*, 1999), doch meistens tritt diese Krankheit gehäuft nach der Geburt und in einem Alter von ca. 9-16 Jahren auf (Moss *et al.*, 1991; Wedekind *et al.*, 2007). Charakteristisch für das Long-QT-Syndrom sind ventrikuläre Tachykardien von Typ Torsades des Pointes (TdP) (Schwartz & Malliani, 1975), die zu einer Reduktion der Pumpleistung des Herzens führen und somit einen Blutdruckabfall zur Folge haben, was sich meist als Synkope (kurzzeitiger Bewusstseinsverlust) manifestiert. Diese Arrhythmien können dabei auch zum plötzlichen Herzstillstand führen und lassen sich durch bestimmte Auslöser wie z.B. Stress, Angst, Schreck, körperliche Anstrengung oder „positive“ Emotionen wie Freude und Aufregung induzieren. Aber auch Anfälle in Ruhe oder während des Schlafs sind beschrieben worden (Schwartz *et al.*, 2001). So konnte in Genotyp-Phänotyp-Korrelationsuntersuchungen von Schwartz *et al.* (2001) gezeigt werden, dass Patienten mit einem LQT2 Syndrom während positiver Gefühlsregungen Synkopen entwickeln. Bei Patienten mit dem LQT3 Syndrom treten die Symptome meist in Ruhe oder im Schlaf auf (Zareba *et al.*, 1998). Bei 12 % aller Patienten, die an einem LQT-Syndrom leiden, ist der plötzliche Herztod oft das erste und einzige Zeichen der Krankheit. Bei ca. 4 % dieser Patienten tritt der Herztod innerhalb des ersten Lebensjahres auf (Schwartz *et al.*, 2000).

### **1.2.1.3 Das Short QT Syndrom (SQTS)**

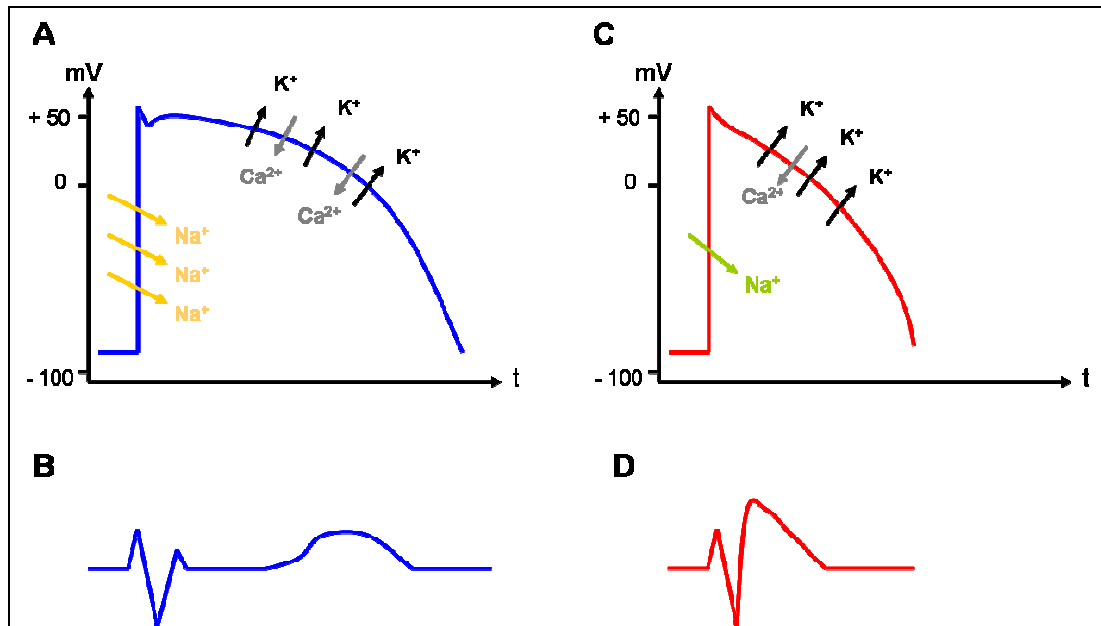
Ein weiteres rhythmologisches Krankheitsbild, welches ebenfalls mit dem plötzlichen Herztod in Verbindung gebracht wird, ist das Short QT Syndrom (SQTS) (Schimpf *et al.*, 2008,). Anders als das LQTS zeigt das EKG der betroffenen Patienten eine verkürzte QT-Zeit ( $< 320$  ms) und eine Formveränderung der T-Wellen (Schimpf *et al.*, 2008). Als molekulare Grundlage konnten bislang fünf Mutationen in den Kaliumkanal-Genen *KCNH2* (SQTS1), *KCNQ1* (SQTS2) und *KCNJ2* (SQTS3), sowie in den Calciumkanal-Genen *CACNA1C* (SQTS4) und *CACNB2* (SQTS5) nachgewiesen werden (Hedley *et al.*, 2009). Im Gegensatz zum LQTS sind die SQTS assoziierten Mutationen in Regionen des Kanalproteins so lokalisiert, dass sie zu einem Funktionsgewinn („gain-of-function“) des Kanals führen. In den Calciumkanal-Genen hingegen haben Mutationen bei SQTS Patienten einen Funktionsverlust („loss-of-function“) zur Folge. Bei beiden Varianten ist die

Repolarisation im Aktionspotenzial und dadurch die QT-Zeit im EKG entsprechend verkürzt (Gussak et al, 2000). 2003 konnten Studien zeigen, dass die Sterblichkeit in den mit SQTs betroffenen Familien hoch und somit das Risiko eines plötzlichen Herztodes erhöht ist (Gaita et al, 2003).

#### 1.2.1.4 Das Brugada Syndrom (BrS)

Beim Brugada Syndrom (BrS) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Krankheit, bei der in 20-50 % der betroffenen Patienten der plötzliche Herztod in der Familiengeschichte bereits mehrfach aufgetreten ist (Brugada et al, 2007). In Asien und Südostasien ist das Syndrom seit einigen Jahren als „sudden unexplained nocturnal death syndrome“ (SUNDS; plötzlicher, ungeklärter, nächtlicher Tod) bekannt, da dort der Tod oftmals nachts eintritt (Eckhardt & Haverkamp, 2007). In ca. 20 % der Fälle kann man Mutationen in dem kardialen Natriumkanal-Gen *SCN5A* nachweisen, welches den Natriumkanal  $Na_v1.5$  am Herzen codiert. Ein typisches BrS-EKG zeigt eine ST-Streckenerhebung bei atypischen Rechtsschenkelblock in den Ableitungen V1 – V3, sowie eine mögliche negative T-Welle (Abb. 1.13d). Während die QT-Zeit normal ist, kann die PQ-Zeit im EKG verlängert sein. Der Grund hierfür sind Mutationen im *SCN5A* Gen, die zum einen zu einer schnelleren Inaktivierung und zum anderen zu einer verminderten Natriumkanal-Dichte in der Membran führen können. Studien konnten zeigen, dass BrS-Patienten mit Mutationen im *SCN5A* Gen eine deutlich verlängerte PQ-Zeit im EKG aufweisen als BrS-Patienten ohne *SCN5A* Mutationen (Smits et al, 2002). Die ST-Streckenerhebung lässt sich auf die nahezu fehlende Plateauphase im kardialen Aktionspotenzial zurückführen (Abb. 1.13c). Durch die beschleunigte Inaktivierung der Natriumkanäle, treten die transienten Kaliumkanäle ( $I_{to}$ ) stärker hervor und fördern dadurch den Verlust der Plateauphase im kardialen Aktionspotenzial. Dies konnte in einer Studie bestätigt werden, da nach Gabe von Substanzen, die die  $I_{to}$  Kanäle blockieren wie z.B. Chindin, das kardiale Aktionspotenzial wieder hergestellt werden konnte. (Eckhardt & Haverkamp, 2007). Klinisch manifestiert sich das Syndrom in polymorphen Kammertachykardien. Da diese Charakteristika mit Unterbrechungen auftreten, erschwert dies eine schnelle Diagnose. Um das Krankheitsbild zu demaskieren, werden in einem solchen Fall Natriumkanal-Blocker wie Ajmalin oder Flecainid verabreicht (Zitron et al, 2005). In den meisten Fällen

treten die Kammertachykardien, die durch das BrS hervorgerufen werden, in der Nacht oder in Ruhe auf, da hierbei der Vagotonus (Parasympatikusfunktion) gesteigert ist (Eckardt L., 2007). Viele asymptomatische Patienten werden erst im Rahmen von Familienuntersuchungen betroffener Patienten entdeckt.



**Abb. 1.13: Schematische Darstellung des kardialen Aktionspotenzials (AP) mit resultierendem EKG.** A) AP beim gesunden Menschen, B) EKG beim gesunden Menschen, C) AP bei Patienten mit Brugada Syndrom, D) EKG bei Brugada Syndrom Patienten.

#### 1.2.1.5 Die katecholaminerge, polymorph-ventrikuläre Tachykardie (CPVT)

Die katecholaminerge, polymorph-ventrikuläre Tachykardie (CPVT) ist eine primär elektrische Herzerkrankung, die bei Kindern und Jugendlichen sowie bei Erwachsenen unter 40 Jahren zu einem erhöhten Risiko eines plötzlichen Herztodes führen kann (Schimpf et al, 2005). Die Sterblichkeitsrate bei unbehandelten Patienten bis zu einem Alter von 40 Jahren liegt bei 30-50 % (Beery et al, 2009). Das normale Ruhe-EKG zeigt bei Patienten mit CPVT keine Veränderung, was die Diagnose erheblich erschwert. Während eines Belastungs-EKGs kann man die charakteristischen ventrikulären Tachykardien erkennen, da es sich um ein belastungsabhängiges Krankheitsbild handelt (Zitron et al, 2005). Als

genetische Grundlage wurden bislang Mutationen in zwei Genen gefunden, die die intrazelluläre Calciumhomöostase regeln. Man unterscheidet zwei Varianten der CPVT: die erste und häufigere Form (CPVT1) zeigt einen autosomal-dominanten Erbgang, der durch Mutationen im Ryanodin Rezeptorgen *RyR2* verursacht wird. In 60 % der CPVT Patienten findet man Mutationen in diesem kardialen Ryanodin Rezeptorgen. Die weitaus seltenere und rezessiv vererbte Form (CPVT2) wird durch Mutationen im Calsequestrin-2 (*CASQ2*) verursacht. In beiden Fällen kommt es zu einer Regulationsstörung der Calciumspeicherung im sarkoplasmatischen Retikulum (Zitron et al, 2005).

Die Herzleistung wird über den Sympathikus und Parasympathikus gesteuert. Soll die Herzleistung erhöht werden, so wird der Sympathikus aktiviert. Hierbei wird ein Signalweg, der über Katecholamine wie Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und über G-Proteine gesteuert wird, aktiviert. Es resultiert ein intrazellulärer cAMP Anstieg, der die cAMP abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert, welche wiederum den Ryanodin Rezeptor phosphoryliert und dadurch die Bindung zum FKBP12.6 löst. Im geschlossenen Konformationszustand bindet FKBP12.6 an je eine Ryanodin Rezeptor Untereinheit und stabilisiert somit den Rezeptor (Marx et al, 2000). Nur wenn FKBP12.6 vom Kanalkomplex dissoziiert ist, öffnet sich der Ryanodin Rezeptor und entlässt  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in die Zelle (Marx et al, 2000). Dieser komplexe Mechanismus gibt dem Krankheitsbild seinen Namen und erklärt auch, warum es zu Tachykardien nur bei Belastung und Aufregung kommt.

### **1.2.2 Strukturelle Herzerkrankungen**

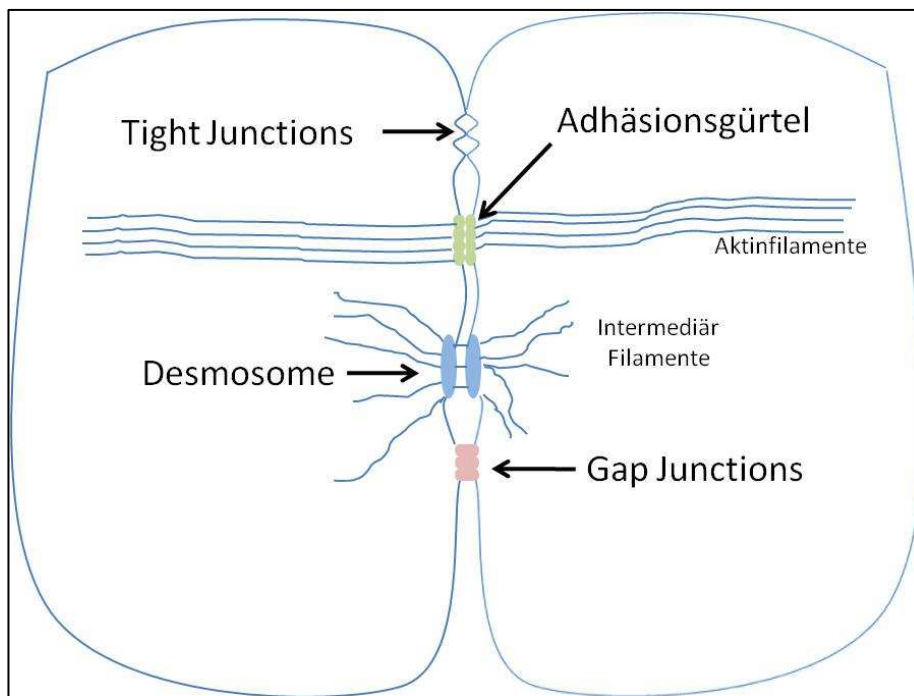
Zu den strukturellen Herzerkrankungen zählt man Krankheiten, die zu morphologischen Veränderungen am Herzen führen. Diese so genannten Kardiomyopathien („Herzmuskelerkrankungen“) sind eine wichtige und heterogene Gruppe von Herzerkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine Strukturveränderung im Myokard ist. Man unterteilt sie in vier verschiedene Klassen: die häufigste Form stellt die dilatative Kardiomyopathie (DCM) dar, bei der sowohl Herzkammern, als auch Herzvorhöfe erweitert sind (Wedekind H., 2003). Bei der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) kommt es zu einer asymmetrischen Verdickung der linken Herzkammer, welche mit einer eingeschränkten Herztätigkeit einhergeht. Besonders junge Sportler sind von der HCM betroffen und stellen einen großen Anteil an jungen Menschen mit plötzlichem Herztod dar (Tester & Ackerman, 2009). Im Fall der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie/Dysplasie (ARVC/D) ist die rechte Herzkammer betroffen, wobei Herzmuskelzellen in Fettzellen umgewandelt werden. Die seltenste Form ist die restriktive Kardiomyopathie (RCM). Hierbei kommt es durch eine vermehrte Einlagerung von Bindegewebe in den Herzmuskel zu einer Verdickung, wodurch die Herzkammer nicht mehr ausreichend gedehnt werden kann (Paul et al, 2009). Viele Kardiomyopathien sind genetisch bedingt und es besteht somit das Risiko, dass weitere Familienmitglieder betroffen sein können. Es wird vermutet, dass Störungen des Zellverbandes ursächlich für Kardiomyopathien sind (Haverkamp et al, 2005).

#### **1.2.2.1 Zell-Zell-Kontakte**

Spezialisierte Zellverbindungen findet man an vielen Zell/Zell- und Zell/Matrix-Kontaktstellen und in allen Geweben. Je nach Funktion lassen sich Zellverbindungen in drei Klassen unterteilen (Kowalczyk, 2008 SaB):

- 1) Undurchlässige Verbindungen, die Zellen in einer Epithelschicht so zusammenhalten, dass selbst kleine Moleküle nicht diffundieren können (z.B. Tight Junctions)

- 2) Haftverbindungen, welche die Zellen auf mechanischem Wege mit ihren Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix verbinden (z.B. Desmosome und Adhäsionsgürtel)
- 3) Kommunizierende Verbindungen, die die Passage chemischer oder elektrischer Signale von Zelle zu Zelle ermöglichen (z.B. Gap Junctions).



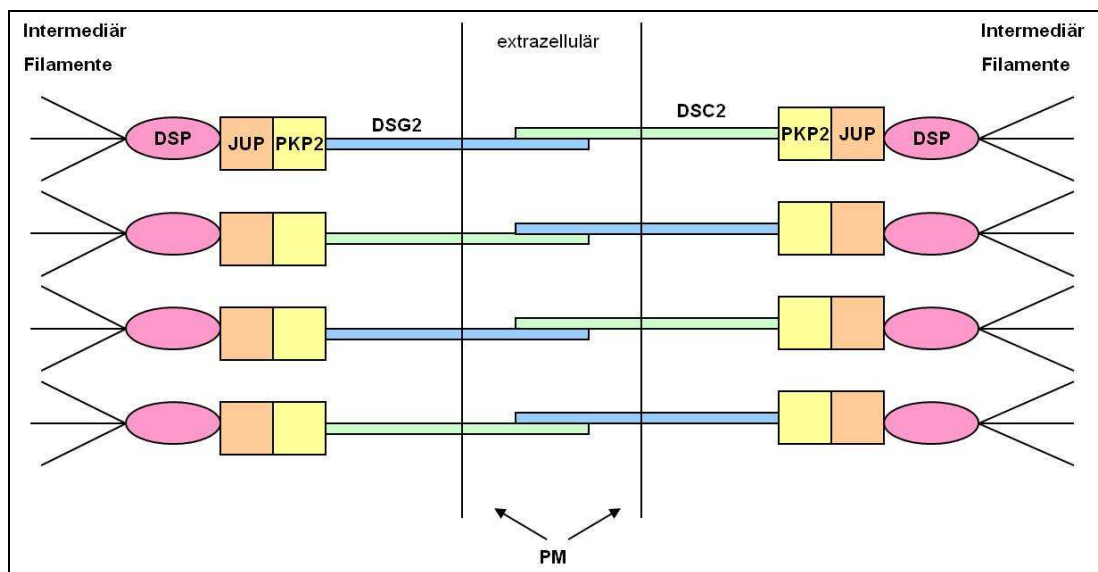
**Abb. 1.14.: Schematische Darstellung der Zell-Zell-Kontakte zweier Zellen.** Tight junctions dienen dem Zusammenhalt der Epithelschicht, ohne Moleküle passieren zu lassen. Der Adhäsionsgürtel verbindet die Nachbarzellen mechanisch über Aktinfilamente miteinander, ebenso wie die Desmosome, die allerdings mit den intermediär Filamenten interagieren. Gap junctions erlauben die Passage chemischer Moleküle oder elektrischer Signale.

#### 1.2.2.1.1 Kardiale Zell-Zell-Kontakte

Um das Herz-Kreislauf-System im Körper aufrecht zu erhalten, muss der Herzmuskel enorme Belastungen und mechanischen Stress aushalten. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, dass die Zellen innerhalb des Herzmuskels zu einem starken Verband miteinander verankert sind. Diese Verankerung wird im Herzen von den Haftverbindungen, den so genannten kardialen Desmosomen, geleistet. Desmosome sind Multikomplexe, die man überwiegend in stark

beanspruchten Geweben wie in der Epidermis und im Myokard findet. Sie verbinden die Zellen sowohl mit ihren Nachbarzellen als auch mit den intermediär Filamenten des Zytoskeletts, wodurch sie dem Gewebe die nötige mechanische Kraft verleihen (Garrod & Chidgey, 2008). Zusammengesetzt sind sie aus drei Komponenten:

1. Desmosomale Cadherine (Desmocollin (DSC) und Desmoglein (DSG)); sie bilden einen interzellulären Kontakt zu Nachbarzellen.
2. Armadillo-Proteine; hierzu zählen Plakoglobin (JUP) und Plakophilin (PKP). Diese interagieren mit dem intrazellulären Teil der desmosomalen Cadherine.
3. Die Plakin-Familie (Plectin und Desmoplakin (DSP)) verbindet intrazellulär die Armadillo-Proteine mit den intermediär Filamenten und leistet somit einen großen Beitrag zur mechanischen Stabilität (Sen-Chowdhry et al, 2005).



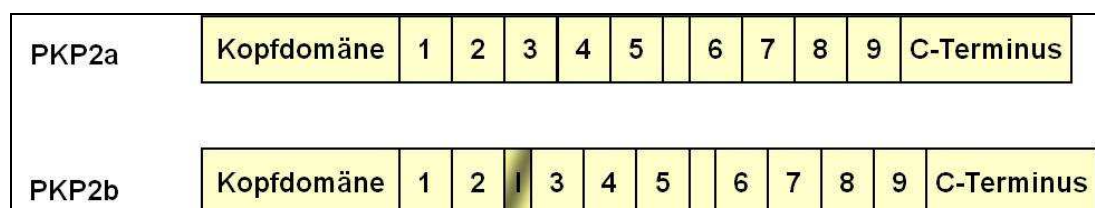
**Abb. 1.15: Schematische Darstellung eines Desmosoms.** DSP: Desmoplakin, DSG2: Desmoglein-2, DSC2: Desmocollin-2, PKP2: Plakophilin-2, JUP: Plakoglobin, PM: Plasmamembran.

Nur wenn alle Komponenten in diesem Komplex einwandfrei funktionieren und aufeinander abgestimmt sind, kann das Myokard die enormen Scherkräfte kompensieren und seine lebenswichtige Tätigkeit ausführen. Bei Fehlern kann es zu einer Lockerung oder gar Auflösung des Zellverbandes kommen, was gravierende Folgen für das entsprechende Gewebe hat.



### 1.2.2.1.2 Plakophilin-2

Das desmosomale Protein Plakophilin-2 gehört zur Familie der Armadillo-Proteine. Die Armadillo-Familie der Adhäsionsmoleküle ist durch aneinander gereihete Armadillo (ARM)–Motive charakterisiert, welche eine Länge von ungefähr 42 Aminosäuren aufweisen. Sie wurden erstmals im *Drosophila melanogaster*-Segmentpolaritätsgen *armadillo* nachgewiesen. Zur Familie der Armadillo-Proteine gehören neben den Plakophilinen und  $\beta$ -Catenin weitere Proteine wie Plakoglobin und die p120-Catenine. Am Beispiel des  $\beta$ -Catenin konnte mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen gezeigt werden, dass die Aminosäuren der ARM-Motive gemeinsam eine positiv geladene Furche bilden, worüber die Armadillo-Proteine mit den desmosomalen Cadherinen interagieren (Huber et al, 1997). Es sind drei Isoformen der Plakophiline bekannt (PKP 1-3). Alle besitzen neun ARM-Motive und eine konservierte Sequenz im N-Terminus, die sogenannte Kopfdomäne, welche ebenfalls an der Assoziation mit den desmosomalen Proteinen beteiligt ist (Chen et al, 2002).



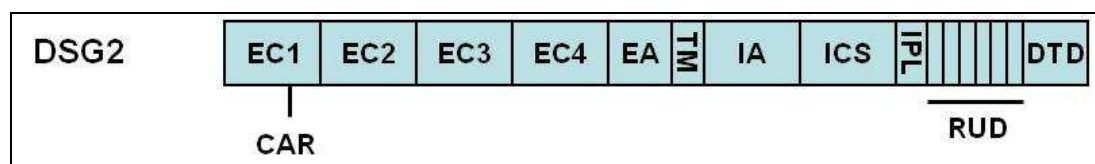
**Abb. 1.16:** Schematische Darstellung der beiden PKP2 Isoformen PKP2a und PKP2b. ARM-Motive 1-9, I: Insertion von 44 Aminosäuren. (Verändert nach Garrod & Chidgey, 2008).

Das Gen *PKP2* codiert das Protein Plakophilin-2 und befindet sich auf Chromosom 12p11 (Bonné et al, 2000). Es sind zwei PKP2-Isoformen bekannt, welche durch alternatives Splicen entstehen (Abb. 1.16). Man bezeichnet sie als *PKP2a* und *PKP2b*, wobei die Isoform *PKP2a* die kürzere Variante ist und 837 Aminosäuren codiert. *PKP2b* codiert 881 Aminosäuren und enthält eine 44 Aminosäuren umfassende Insertion zwischen dem zweiten und dritten Armadillo-Motiv (Mertens et al, 1996). Plakophilin-2 interagiert mit vielen Komponenten der Desmosomen wie z.B. den desmosomalen Cadherinen und Plakoglobin (Garrod & Chidgey, 2008). Neben der Interaktion mit anderen desmosomalen Komponenten, kann Plakophilin-2 mit  $\beta$ -Catenin interagieren und dadurch eine regulierende Funktion auf zelluläre Signalwege ausüben (Chen et al, 2002). 2000 konnte Plakophilin-2 im Zellkern

nachgewiesen und festgestellt werden, dass *PKP2* mit der großen Untereinheit der Polymerase III interagiert und somit Einfluss auf die Initiation der Transkription nehmen kann (Mertens et al, 2001). Es konnten gezeigt werden, dass die Isoform *PKP2* hauptsächlich im Herzen exprimiert wird, und Mutationen in diesem Gen bei Patienten mit einer strukturellen Herzerkrankung (arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie) gefunden und in Zusammenhang gebracht werden konnte (Dalal et al, 2006).

### 1.2.2.1.3 Desmoglein-2

Das Gen *DSG-2* codiert das Protein Desmoglein-2 und befindet sich auf dem q-Arm des Chromosoms an Position 18q12.1-q12.2 (Pilichou et al, 2006). Es umfasst 49 kb, wobei der kodierende Bereich in 15 Exons gegliedert ist. Desmoglein-2 zählt zu den desmosomalen Cadherinen und gehört zu den Transmembran-Glykoproteinen. Es wird in drei Bereiche eingeteilt: eine N-terminale extrazelluläre Domäne, eine Transmembran-Region und eine C-terminale cytoplasmatische Domäne (Getsios et al, 2004; Koch et al, 1990). Sie sind direkt an der Interaktion mit den desmosomalen Proteinen der Nachbarzellen beteiligt. Die extrazelluläre Domäne ist in vier Subdomänen unterteilt (EC1-4) und jede umfasst rund 110 Aminosäuren (Abb. 1.17). EC1 ist für die Adhäsionsfunktion der desmosomalen Cadherine von großer Bedeutung, da sich in dieser Subdomäne entsprechende Binde- und Erkennungsmotive befinden. Zwischen den einzelnen EC Bereichen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen lokalisiert, welche an der Konformationsbildung des Proteins beteiligt sind.



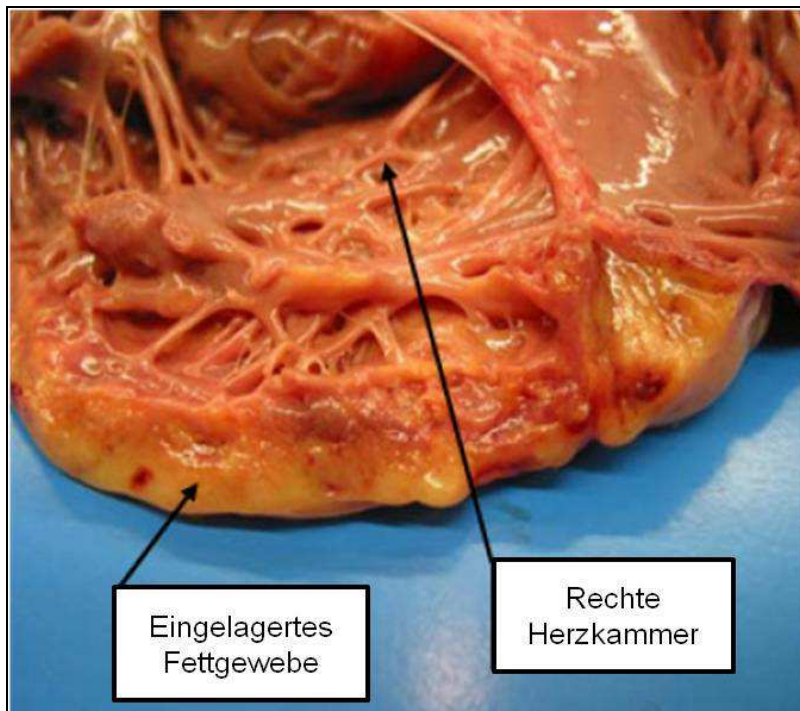
**Abb. 1.17: Schematische Darstellung des kardialen Desmoglein.** CAR: Cell Adhesion recognition site bewirkt die starke Haftung, EC1-4: extrazelluläre Domänen, EA: extrazellulärer Anker, TM: Transmembranbereich, IA intrazellulärer Anker, ICS: intrazelluläre Cadherin-spezifische Domäne - Bindebereich für weitere desmosomale Proteine, IPL: intrazellulärer Prolin-Linker, RUD: Repeating Unit-Domäne, DTD: Glycin-reiche, terminale Domäne. (verändert nach Garrod & Chidgey, 2008).

Die daran anschließende extrazelluläre Ankerdomäne (EA) bildet eine fünfte extrazelluläre Domäne. Die cytoplasmatische Domäne des Desmoglein-2 besitzt ebenfalls eine Subdomäne, die Cadherin-spezifische Domäne (ICS-Domäne), welche für die Bindung und Interaktion mit anderen intrazellulären Cadherinen oder Armadillo-Proteinen verantwortlich ist (Abb.1.17). Zusätzlich trägt das Desmoglein-2 einen so genannten Prolin-reichen Linker (IPL) und eine terminale Repeating Unit-Domäne (RUD), über deren Funktion zurzeit noch geforscht wird (Garrod & Chidgey, 2008).

Es sind vier Isoformen der Desmoglein Familie bekannt (DSG1-4) (Awad et al, 2006). Da die Expression von *DSG-2* im Myokard stark ausgeprägt ist, ist es eines der wichtigsten Gene, welche mit der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) assoziiert werden (Awad et al, 2006; Pilichou et al, 2006).

#### **1.2.2.2 Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)**

Die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) ist eine Herzmuskelerkrankung, die überwiegend den rechten Ventrikel betrifft. Morphologisch ist diese Erkrankung durch Degeneration und Atrophie des rechtsventrikulären Myokards mit nachfolgendem Ersatz durch Fett- und Bindegewebe charakterisiert (Wichter T., 2009). Während der Erkrankung entsteht im Herzmuskel ein Mosaik aus Fett-, Bindegewebs- und Muskelzellen, welches zu einer verzögerten Erregungsleitung führt (Abb. 1.18). Die resultierenden Arrhythmien werden zu Beginn der Krankheit durch körperliche Belastung, Sport oder Stress ausgelöst. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu ansteigenden, segmentalen und anschließend zu globalen Kontraktionsstörungen des rechten Ventrikels. Im Spätstadium der ARVC kann der linke Ventrikel ebenfalls betroffen sein (Haverkamp et al, 2005).



**Abb. 1.18.: Ausschnitt eines an ARVD erkrankten Herzens.** Die Abbildung zeigt den rechten Ventrikel dessen Myokard durch Fett ersetzt wurde (verändert nach Herren et al, 2009).

Die ARVC wurde 1978 beschrieben und anfangs als rechtsventrikuläre Dysplasie bezeichnet. Seit 1995 wird sie allerdings den Kardiomyopathien zugeordnet und als solche benannt. Die Prävalenz der ARVC liegt in der westlichen Welt bei ca. 1:5.000 – 1:10.000 (Haverkamp et al, 2005). Die Erstsymptomatik entwickelt sich oft im Jugendalter oder im frühen Erwachsenenalter (15 – 35 Jahren). Männer sind häufiger betroffen als Frauen und zeigen meist stark ausgeprägte Verlaufsformen. Als Erstmanifestation zeigen sich ventrikuläre Tachykardien; während des Krankheitsverlaufes kommen Palpitationen und Synkopen hinzu, mitunter auch der plötzliche Herztod (Wichter T., 2009).

Bei der familiären Form der ARVC handelt es sich um einen autosomal-dominanten Erbgang, bei dem in 30-50% der Familienangehörigen von ARVC-Patienten klinische Hinweise auf eine Krankheitsmanifestation zeigen (Haverkamp et al, 2005). Zurzeit konnten 12 Formen der ARVC identifiziert und Mutationen in acht verschiedenen Genen lokalisiert werden (Tab. 1.2).

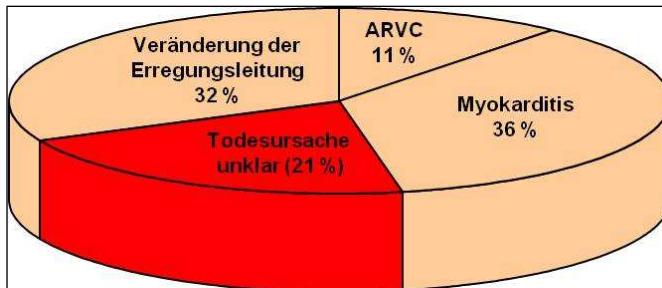
Typ	Gen	Protein	Chromos. Lokus	Häufigkeit in %
ARVC-1	<i>TGF-β3</i>	Transformations-Wachstumsfaktor β-3	14q24	
ARVC-2	<i>RyR2</i>	Ryanodin Rezeptor	1q42-q43	Einzelfälle
ARVC-3			14q12-q22	Einzelfälle
ARVC-4			2q32	Einzelfälle
ARVC-5	<i>TMEM43</i>	Transmembran Protein 43	3p23	Einzelfälle
ARVC-6			10q22.3	Einzelfälle
ARVC-7				Einzelfälle
ARVC-8	<i>DSP2</i>	Desmoplakin-2		10
ARVC-9	<i>PKP2</i>	Plakophilin-2	12p11	30
ARVC-10	<i>DSG2</i>	Desmoglein-2	18q12.1-q12.2	7
ARVC-11	<i>DSC2</i>	Desmocollin-2	18q12.1	3
ARVC-12 Naxos	<i>JUP</i>	Plakoglobin (Junction)	17q21	Einzelfälle

**Tabelle 1.2: Übersicht der verschiedenen ARVC Typen.** Bei den offenen Feldern in der Tabelle handelt es sich um noch unbekannte Gene und Proteine. Die Häufigkeiten sind in Prozent dargestellt und beziehen sich auf die Verteilung innerhalb des Krankheitsbildes der ARVC (verändert nach Paul et al, 2009).

Es handelt sich hierbei um Gene, die die desmosomalen Zellkontaktproteine DSP, PKP2, DSG2, DSC2 und JUP (Rampazzo et al, 2002, Gerull et al, 2004, Pilichou et al, 2006, Syrris et al, 2007, Asimaki et al, 2007) codieren. Aber auch Mutationen in Genen, die die Expression von Zellkontaktproteinen modulieren wie TGF-β3 und TMEM43 (Bauce et al, 2010) und Mutationen im Calcium-freisetzenden Ionenkanal RyR2 (Tiso et al, 2001) sind bekannt. ARVC ist somit als Erkrankung des Desmosoms anzusehen. Es wird vermutet, dass es durch die Mutationen zum einen zu einer gestörten Expression des betroffenen Proteins und zum anderen zu einer Fehlbildung der desmosomalen Proteine kommt, wodurch das Zusammenwirken des Zellverbandes gestört wird. Bei mechanischer Dehnung kann dies zur Ruptur der Zellkontakte und somit zum Zelluntergang mit anschließender Fetteinlagerung führen (Wichter T., 2005).

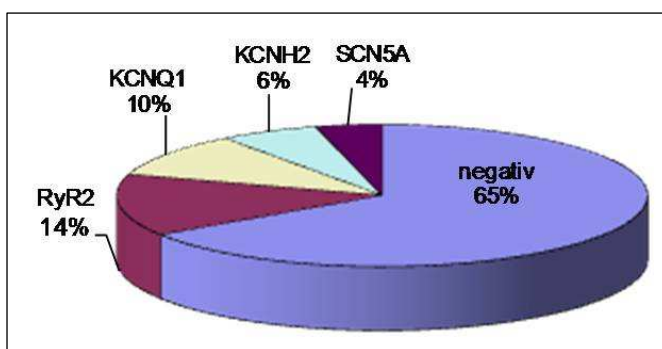
### 1.3 Molekulare Autopsie

Primäre elektrische Herzerkrankungen sind für ca. ein Drittel autopsisch-negativer Todesfälle verantwortlich (Tester & Ackerman, 2007).



**Abb. 1.19: Verteilung der Todesursachen bei Personen < 35 Jahren in Italien.** (verändert nach Kauferstein et al, 2009).

Die Ursache derartiger Ereignisse liegt in Gendefekten spezifischer kardialer Proteine begründet. Dadurch kann es zu Herzrhythmusstörungen und zum plötzlichen Herztod kommen. Zu den primär elektrischen Herzerkrankungen gehören zu einem großen Teil die Ionenkanalerkrankungen, wie LQTS, SQTS, BrS und CPVT. Aber auch im frühen Stadium der ARVC kann man noch keine morphologische Veränderung des Herzens feststellen. Wie eingangs erwähnt, werden diese Erkrankungen, beim plötzlichen Herztod und bei der Obduktion nicht erkannt. Rechtsmediziner können bei unklarer Todesursache nur Vermutungen anstellen, ob eine primär elektrische Herzerkrankung todesursächlich war. In solch einem Fall findet die molekulare Autopsie ihre Anwendung.



**Abb. 1.20: Diagramm über den Anteil genetischer Ionenkanal-Erkrankungen bei Verstorbenen in jungen Lebensjahren, n= 49** (Tester & Ackerman, 2007)

Eine Studie aus dem Jahr 2007 (Tester & Ackerman, 2007) zeigte, dass bei 35 % von plötzlichen Herztodesfällen eine kardiale Ionenkanalerkrankung zugrunde lag und belegt gleichzeitig, wie wichtig die Suche nach potentiell lebensbedrohlichen

Mutationen im Hinblick auf die Todesursachenermittlung ist. Die molekulare Autopsie stellt somit ein wichtiges diagnostisches Werkzeug bei der forensischen Beurteilung derartiger Todesfälle dar (Kaufenstein et al, 2009).

In den meisten Fällen handelt es sich bei den primär elektrischen Herzerkrankungen um vererbte Erkrankungen mit einem autosomal-dominanten Erbgang. Das bedeutet, dass ein 50%-iges Risiko für Familienangehörige besteht, von dieser Krankheit ebenfalls betroffen zu sein. Für diese Familien ist eine genetische Untersuchung von großer Bedeutung, um einen weiteren plötzlichen Herztod bei einem Familienmitglied zu verhindern. Durch diese Untersuchung kann aber auch Gewissheit erlangt werden, nicht Träger von Mutationen in den betroffenen Genen zu sein, die diese Krankheit auslösen. In welchem Umfang asymptotische Genträger von einer prophylaktischen Therapie profitieren, ist derzeit noch nicht geklärt. Bei positivem Befund innerhalb einer Familie mit plötzlichem Herztod sollten eine humangenetische Beratung und eine kardiologische Untersuchung des betroffenen Angehörigen zur Risikoanalyse unbedingt durchgeführt werden.

#### **1.4 Ziel dieser Dissertation**

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Erkenntnisse über genetisch bedingte Ionenkanalerkrankungen erzielt. Durch die Identifizierung der mit diesen Krankheiten assoziierten Gene und deren Proteine ist deutlich geworden, wie wichtig die Untersuchung von Mutationen in diesen Genen, besonders in Hinblick auf den plötzlichen Herztod, ist. Die Suche nach Mutationen in Ionenkanal-Genen bei Personen mit unklarer Todesursache ist somit ein wichtiger diagnostischer Ansatz bei der forensischen Beurteilung derartiger Todesfälle. Ebenso ist die Suche nach genetischen Markern, welche nicht zwangsläufig zum Tode führen müssen, aber vielleicht eine Prädisposition für einen plötzlichen Herztod bilden, ein wichtiger Aspekt. Daher war ein Ziel dieser Dissertation die molekular-genetische Untersuchung von jungen, an plötzlichem Herztod Verstorbenen. Da es sich bei den primär elektrischen Herzerkrankungen um vererbte Krankheiten handelt, kommt in gesicherten Fällen der klinischen Untersuchung und gegebenenfalls der genetischen Abklärung und Beratung von Familienangehörigen eine wichtige Bedeutung zu, vor allem im Hinblick auf die mögliche Prävention eines plötzlichen Herztods. Die Untersuchung von Patienten mit einer definierten Herzerkrankung war daher ein weiteres Ziel dieser Dissertation. Veränderungen in Genen, Polymorphismen wie Mutationen, die mit Herzerkrankungen in Verbindung gebracht wurden, standen hierbei im Vordergrund der Untersuchungen.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 DNA-Isolierung**

##### **Lyse-Mix**

10 mM Tris (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
10 mM EDTA (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
100 mM NaCl (Fa. Roth, Karlsruhe)  
2 % SDS (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
ad 250 ml aqua<sub>dest.</sub> pH 8,0 +/- 0,5; autoklavieren,  
Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Proteinkinase K**

20 mg/ml (Fa. Merck, Darmstadt)  
aliquotieren und bei -20 °C lagern

##### **Phenol-Chloroform**

Phenol-Chloroform-Gemisch (Fa. Roth, Karlsruhe)  
50:50 mit TE-Puffer gesättigt, pH 8,0 Lagerung bei 4-8 °C lichtgeschützt

##### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
1 mM EDTA

##### **Natriumacetat (1,5 M)**

61,5 g Natriumacetat (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
ad 500 ml aqua<sub>dest.</sub> mit Essigsäure auf pH 4,5  
Lagerung bei Raumtemperatur

##### **Isopropanol**

Fa. Roth, Karlsruhe  
Lagerung bei Raumtemperatur

**Glasmilch**

Glasmilch UltraBind (Fa. Dianova)

Lagerung bei Raumtemperatur

**70% Ethanol**

Fa. AppliChem, Darmstadt, Lagerung bei Raumtemperatur

**Aqua ad iniectabilia**

Fa. Braun, Melsungen

**2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

**DNA-Proben**

Die DNA-Proben wurden mit einer Konzentration von 200 ng/μl in die PCR eingesetzt

**Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP)**

Fa. Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

**Taq Gold Polymerase**

Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

**10x PCR Puffer**

Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

**Glycerin**

Fa. AppliChem, Darmstadt

**Formamid**

Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

**Aqua ad iniectabilia**

Fa. Braun, Melsungen

### **Primer**

100 µM Stammlösung  
Fa. Biospring, Frankfurt

## **2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese**

### **Agaroselösung (2,5 %)**

3,75 g Agarose (Fa. SeaKem, BioScience, Rockland, USA)  
in 150 ml 1x TBE-Puffer aufkochen

### **TBE-Puffer (10x)**

0,89 M Tris-Base (Tris ultrapure, Fa. AppliChem, Darmstadt)  
0,89 M Borsäure (Fa. ICN Biomedicals)  
2 mM EDTA (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
pH-Wert mit HCl auf 8,3 einstellen

### **Ethidiumbromid Stammlösung**

10 mg/ml (Fa. Serva, Heidelberg)  
nicht autoklavieren, lichtgeschützt bei 4 °C lagern

### **Ladepuffer**

30 vol. % Glycerin (Fa. AppliChem, Darmstadt)  
0,25 vol. % Bromphenolblau (Fa. Serva, Heidelberg)  
10 mM Tris-HCl bzw. 1x TBE

### **Längenstandard**

- DNA Molecular Weight Marker XIV (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)  
100 base pair ladder (50 µg), Lagerung bei –20 °C
- DNA Molecular Weight Marker X (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)  
0.07 – 12.2 kbp (0,25 µg/µl), Lagerung bei –20 °C

### **Gel Extraction Kit**

Fa. Qiagen, Hilden

#### 2.1.4 Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC)

##### **Wave low-range mutation control standard**

Fa. Transgenomic, Omaha, USA

##### **Triethylamonium Acetat (TEAA)**

Fa. Transgenomic® Bioconsumables™, Omaha, USA

##### **LiChrosolv® Wasser für Chromatographie**

Fa. Merck, Darmstadt

##### **Acetonitril**

Fa. Roth, Karlsruhe

	<b>TEAA Solution</b>	<b>Acetonitril</b>	<b>LiChrosolv®</b>
Puffer A	50 mL	800 µL	950 mL
Puffer B	50 mL	250 mL	700 mL
Puffer C	-	750 mL	250 mL
Puffer D	-	80 mL	920 mL

**Tabelle 2.1: Pufferansätze für die DHPLC**

#### 2.1.5 Sequenzierung

##### **Big Dye ® Terminator Ready Reaction Mix**

Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

##### **Big Dye ® Terminator Sequencing Puffer (5x)**

Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt

##### **HPLC-H<sub>2</sub>O**

Water G Chromasolv® for Gradient elution

Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

**Primer**

100 µM Stammlösung

Fa. Biospring, Frankfurt

**DyeEx 2.0 Spin Kit for Terminator Removal**

Fa. Qiagen, Hilden

**2.1.6 TA Klonierung**

**pGEM®-T Vector System II**

Fa. Promega, Madison, USA

**Kompetente Zellen**

- JM 109 High Efficiency Competent Cells, *E.coli*  
Fa. Promega, Madison, USA
- XL10-Gold ultracompetent cells, *E.coli*  
Fa. Agilent Technologies, Waldbronn

**LB-Amp-Medium XGAL IPTG**

Pulver in 200 mL H<sub>2</sub>O dest. geben und erhitzen

Fa. Fermentas, St. Leon-Rot

**LB-Medium (1 Liter)**

10 g Trypton (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

5 g Bacto-Yeast-Extrakt (Fa. Gibco BRL, Eggenstein)

10 g NaCl

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen, autoklavieren

**Ampicillin-Stammlösung**

50 mg/ml Ampicillin in Aqua<sub>dest</sub> lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren

Lagerung bei -20 °C

Fa. Roche Diagnostics, Mannheim

**QIAprep Spin Miniprep-Kit**

Fa. Qiagen, Hilden

### 2.1.7 QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenese

#### **QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit**

Fa. Agilent Technologies, Waldbronn

#### **Vektor pSP64T mit SCN5A**

Bezogen von der Arbeitsgruppe Tytgat, Leuven Belgien

#### **Vektor pSP64 mit KCNH2**

Bezogen von der Arbeitsgruppe Tytgat, Leuven Belgien

#### **Primer**

100 µM Stammlösung

Fa. Biospring, Frankfurt

(Sequenzen s. Anhang)

#### **XL10-Gold ultracompetente Zellen, *E.coli***

Fa. Agilent Technologies, Waldbronn

#### **NZY<sup>+</sup> Medium**

Fa. Roth, Karlsruhe

### 2.1.8 RNA Synthese

#### **Restriktionsenzym:**

XbaI, New England Biolabs, Frankfurt

EcoRI, New England Biolabs, Frankfurt

#### **MinElute® Reaction Cleanup Kit**

Fa. Qiagen, Hilden

#### **mMessage mMachine® Kit**

Fa. Ambion, Austin (USA)

### 2.1.9 Elektrophysiologie an Oozyten

#### **ND96 (10x):**

96 mM NaCl (56,1 g/l), 2 mM KCl (1,59 g/l), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (2,03 g/l),

1 mM CaCl<sub>2</sub> (1,47 g/l), 5 mM HEPES (11,92 g/l) pH 7,5

Fa. AppliChem, Darmstadt

#### **Messlösung:**

100 ml ND96 (10x), 900 ml ddH<sub>2</sub>O

#### **Aufbewahrungslösung:**

100 ml ND96 (10x), 900 ml ddH<sub>2</sub>O, 1ml Gentamycin (50 mg/ml)

Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

#### **Ca<sup>2+</sup>-freie Ringerlösung:**

96 mM NaCl (56,1 g/l), 2 mM KCl (1,59 g/l), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (4,06 g/l), 5  
mM HEPES

(11,92 g/l) pH 7,5

Fa. AppliChem, Darmstadt

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 DNA Isolierung

Die zu untersuchenden Proben wurden vom Institut für Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt bereit gestellt. Desweiteren wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Molekulare Grundlagen zur Diagnostik und Ätiologie genetisch bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen als Auslöser des plötzlichen Herztodes“ Blutproben von Patienten der Kerckhoff Klinik zur Verfügung gestellt.

Zur Isolierung der genomischen DNA müssen die Zellen und Zellkerne aufgebrochen und von zellulären Proteinen befreit werden. Hierzu dient die Alkohol-Fällung in Verbindung mit einem monovalenten Salz.

#### Durchführung:

Folgende Angaben gelten für einen Reaktionsansatz:

- 20 µl Blut wird in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt
- Zugabe von 500 µl Lyse-Mix
- Zugabe von 20 µl Proteinkinase K
- Lyse-Reaktion erfolgt über Nacht bei 50 °C (Gefäße mit Alufolie bedeckt) im Heizblock (Accu Block, Digital Dry Bath, Fa. Labnet)

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgen unter dem Abzug:

- Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform
- Vortexen und 5 Minuten bei 13.000 rpm (bzw. 15.000 g) zentrifugieren
- Die obere, wässrige Phase enthält die DNA und wird in ein neues Cup überführt, das Volumen sollte nicht unter 500 µl liegen – ansonsten wird erneut zentrifugiert
- Zugabe von 10 µl 1,5 M Natriumacetat und 1 Volumen (500 µl) Isopropanol zur Fällung der DNA
- 3 µl Glasmilch hinzugeben
- Gemisch vortexen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren



- Pelletierung der DNA durch 15 Minuten zentrifugieren bei 13.000 rpm
- Überstand verwerfen und Pellet mit 1 ml 70% Ethanol waschen (nicht resuspendieren)
- 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Ethanol abziehen und 10-60 Minuten bei 56 °C mit offenem Deckel inkubieren
- 60 µl H<sub>2</sub>O hinzugeben (nicht resuspendieren)
- Inkubation für eine Stunde bei 56 °C oder über Nacht bei 4 °C

Der Überstand der Probe enthält die isolierte und gereinigte DNA und kann in die PCR eingesetzt werden.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Zentrifuge Multifuge 1 L-R, Fa. Heraeus durchgeführt.

Im Anschluss an die DNA-Isolierung wird die DNA-Konzentration mittels NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer V3.1.0 bestimmt. Über die Extinktion bei 260/280 nm werden der Nukleinsäuregehalt und die Reinheit der Probe gemessen.

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient der exponentiellen Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnitts 'in vitro' und wurde von Saiki *et al.* (1988) entwickelt (Saiki et al, 1988). Ein einzelner PCR-Zyklus läuft in drei Abschnitten ab:

- Denaturierung: Trennung der beiden Template-DNA-Stränge durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94 °C
- Annealing: Hier erfolgt die Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer an die einzelsträngige Template-DNA
- Elongation: Ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen komplementären DNA-Strang bei einer Temperatur von 72 °C

Da beim Durchlaufen eines jeden Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird, kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz.

Die am häufigsten verwendete DNA-Polymerase ist die Taq-Polymerase. Sie wurde erstmals aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und verlängert in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP) die Primer entlang der DNA-Matrize zu einem komplementären DNA-Strang. Die Primer sind komplementär zur Zielsequenz und definieren den zu synthetisierenden Bereich der Template-DNA.

#### Durchführung:

Wenn nicht anders vermerkt, sind die Reaktionsansätze für die verschiedenen Gene gleich:

<u>Komponente</u>	<u>Volumen in <math>\mu</math>l</u>
DNA	1
10x Puffer	2,5
dNTP (2mM)	2
Hin Primer (10 $\mu$ M)	1
Rück Primer (10 $\mu$ M)	1
Taq-Gold (5 U/ $\mu$ l)	0,3
H <sub>2</sub> O	17,2

Um ein besseres PCR Ergebnis zu erzielen, wurde bei einigen Primerpaaren 2,5  $\mu$ l Glycerin und 1  $\mu$ l Formamid in einen 25  $\mu$ l Ansatz zugegeben.

In den folgenden Tabellen sind je nach Gen die verschiedenen PCR Bedingungen für die Amplifikation aufgelistet. Für die unterschiedlichen Gene wurden verschiedenen PCR Bedingungen angewandt. Alle PCRs erfolgten im T3000 Thermocycler oder TProfessional Standard Thermocycler der Fa. Biometra, Göttingen.

Tabelle 2.2: hERG Primer

Exon	Herg-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
2	3	GGT CCC CGC TCA CGC GCA CTC TC	2
	4	TTG ACC CCG CCC CTG GTC GT	5 % DMSO
3	5.1	GCC CAC TGA GTG GGT GCC AAG	2
	6.1	CCA CGA ACC CCT GAG CCT GCC	
4	7spl	CTC CGG GGC TGC TCG CGA T	1
	8spl	CAC CAG CGC ACG CCG CTC CT	10 % DMSO
	9spl	GCC ATG GAC AAC CAC GTG GCA	1
	10spl	CCC AGA ATG CAG CAA GCC TG	10 % DMSO
5	11	GGC CTG ACC ACG CTG CCT CT	1
	12	CCC TCT CCA AGC TCC TCC AA	
6	13	CAG AGA TGT CAT CGC TCC TG	1
	14	CAG GCG TAG CCA CAC TCG GTA G	
	15	CGA CGT GCT GCC TGA GTA CAA	1
	16	CAC CTC CTC GTT GGC ATT GAC	
	17	TTC CTG CTG AAG GAG ACG GAA G	1
	18	TAC ACC ACC TGC CTC CTT GCT GA	
7	19	TGC CCC ATC AAC GGA ATG TGC	1
	20	CAG CCA GCC GAT GCG TGA GTC CA	
	21	TAG CCT GCA TCT GGT ACG C	1
	22	GCC CGC CCC TGG GCA CAC TCA	
8	23	TGG GGT CCC TGC AGA GGC TGA C	2
	24	CTT CCC AGC CTG CCA CCC ACT G	
9	25	GGC CTG GAG GTT GAG ATT TC	1
	26	GCG GTG CAT GTG TGG TCT TG	
	27	GCA CTG CAA ACC CTT CCG AG	1
	28	GGC ATT TCC AGT CCA GTG C	
10	29	TGA GCT CCC TGT CCT CTC CAT G	1
	30	CTC AGG GCA GCC AAC TCA CAT C	
11	31	GGT GGG GCA GGA GAG CAC TG	2
	32	TCC CCC GCC TCA CCC TTG TC	
12	33.3	CTC TGT TTC CCA CAG ACA CG	1 (56 °C)
	34.3	CTG GGT GAG CGG GGT AGA CG	5 % DMSO
13	35.1	CCG CTC ACC CAG CTC TGC TCT C	2
	36.1	CAG GGC GTG CCC CCC CAC CCC	
14	37	ACT CCC GGT GGA GGC TGT CA	1
	38	GAA CAA GCG GGT CAC GGT AC	
15	39	TCC TGT CCT CCC GTC CAT C	1
	40	ACG TGT CCA CAC TGG GCA G	

Programm: **1** **hERG**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**58 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 5'

Programm: **2** **Herg64**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**64 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 7'

Tabelle 2.3: SCN5A-Primer

Exon	SCN5A-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
1	1.2	CCA GCC CGA GCC CGC GCC GCC	2
	2.2	GGA AAG TTG GGC GGC GGC AG	
2	3	GGT CTG CCC ACC CTG CTC TCT	1
	4	CCT CTT CCC CCT CTG CTC CAT T	
3	5	AGT CCA AGG GCT CTG AGC CAA	1
	6	GGT ACT CAG CAG GTA TTA ACT GCA A	
4	7	GGT AGC ACT GGC CTG GCA GTG AT	1
	8	CCT GGA CAC AAG CCC CCT TC	
5	9	TCA CAC CAC GTA AGG AAC CTG	1
	10	ATG TGG ACT GCA GGG AGG AAG C	
6	11	CCT TTC CTC CTC TGA CTG TGT GT	1
	12	GGT ATT CTG GTG ACA GGC ACA TTC	
7	13	CCA CCT CTG GTT GCC TAC ACT G	1
	14	GTC TGC TGG TCT CAC AAA GTC TTC	
8	15	AGA GTG CCC CTC ACC AGC ATG	1
	16	GGA GAC TCC CCT GGC AGG ACA A	
9	17	GGG AGA CAA GTC CAG CCC AGC AA	1
	18	AGC CCA CAC TTG CTG TCC CTT G	
10	19	ACT TGG AAA TGC CAT AAC CCA GA	1
	20	CAC CTA TAG GCA CCT ACA GTC AG	
11	21	AAA CGT CCG TTC CTC CAC TCT	1
	22	AAC CAC AGC TGG GAT TAC CAT T	
12	23	GGC CAG TGG CAC AAA AGA CAG GCT	1
	24	CCC TGG GCA CTG GTC CGG CGC A	
	25	CAC CAC ACA TCA CTG CTG GTG C	1
	26	GGC ACT GGT GAT CAG TTT GGG AGA	
13	27	CCC TTT TCC CCA GGC TGA CGC AAA	1
	28	GTC TAA AGC AGG CCA AGA CAA ATG	

Exon	SCN5A-Primer	Sequenz (5' → 3')	Programm
14	29	CTG GAA GGT ATT CCA GTT ACA TAT GA	1
	30	ACC CAT GAA GGC TGT GCC AGC TGC	
15	31	CTT TCC ATC CCA AAC AAT TCC T	1
	32	CCC CAC CAT CCC CCA TGC AGT	
16	33	GAG CCA GAG CCC TTC ACA AGG TCC TCT	1
	34	CCC TTG GCC AAC TTA CCA CAA G	
17	35.2	CTG GAT GGC TTG GCA TGG TGC AG	2
	36.2	GGG TGG CGG GGA GTA GGG GGT G	
	37	GCC CAG GGC CAG CTG CCC AGC T	1
	38	CTG TAT ATG TAG GTG CCT TAT ACA TG	
18	39	AGG GTC TGA AAC CCC CAG GGT CA	1
	40	CCC AGC TGG CTT CAG GGA CAA A	
19	41.2	GGC TGC TAC TCA GCC CAC ACT C	1
	42.2	CTG GTC CTC CTG TCC CCT CTG G	
20	43.2	GGC ATT CAC AGG CCC TGA GGT GGG	1
	44.2	CTT TCC AGC TGG AGA CCT CCT TTC C	
21	45	TCC AGG CTT CAT GTC CAC CTT GTC T	1
	46	TCT CCC GCA CCG GCA ATG GGT	
22	47.2	GTC CCC AAC AGT GGG GAG CTG TTC	1
	48.2	CCG CCT CCC ACT CCC TGG TGG	
23	49	TTG AAA AGG GCA TGT GCT CTG GG	2
	50	CAC ATC ATG GGT GAT GGC CAT	
24	51	CTC AAG CGA GGT ACA GAA TTA AAT GA	1
	52	GGG CTT TCA GAT GCA GAC ACT GAT	
25	53	GCC TGT CTG ATC TCC CTG TGT GA	1
	54	CCT GGA GCC TGA GTG GCC CCT C	
26	55.2	CCA TGC TGG GGC CTC TGA GAA C	1
	56.2	GGC TCT GAT GGC TGG CCA TGT G	
27	57	CCC TGC TGA GCA CTT TCC ATT TG	1
	58	GCT TCT CCG TCC AGC TGA CTT GTA	
28	59.2	GCT GGC TGG AAG ACA GAG GTG C	1
	60.2	GGT GAT CTG GAA GAG GCA CAG C	
	61	AAG TGG GAG GCT GGC ATC GAC	1
	62	GTG CTC TCC TCC GTG GCC ACG C	
	63	GAG CCC AGC CGT GGG CAT CCT	1
	64	GTC CCC ACT CAC CAT GGG CAG	
	65	CCA ACC AGA TAA GCC TCA TCA ACA	1
	66	CCG CCT GCT GAC GGA AGA GGA	
	67	TGC TGC AAC GCT CTT TGA AGC AT	1
	68	AAA GGC TGC TTT TCA GTG TGT CCT	

Programm: **1** **SCN5A**

95 °C 10'

**95 °C 20s**

**58 °C 40s**

**72 °C 1'**

x36

72 °C 7'

Programm: **2** **SCN5A 64**

95 °C 10'

**95 °C 20s**

**64 °C 40s**

**72 °C 1'**

x36

72 °C 7'

Tabelle 2.4: KCNQ1 Primer

Exon	KCNQ1-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
1	1	CTC GCC TTC GCT GCA GCT C	1 (64 °C)
	2	GCG CGG GTC TAG GCT CAC C	5 % DMSO
	3	CGC CGC GCC CCC AGT TGC	1 (64 °C)
	4	CAG AGC TCC CCC ACA CCA G	10 % DMSO
2	5	ATG GGC AGA GGC CGT GAT GCT GAC	2
	6	ATC CAG CCA TGC CCT CAG ATG C	
3	7	GTT CAA ACA GGT TGC AGG GTC TGA	2
	8	CTT CCT GGT CTG GAA ACC TGG	
4	9	CTC TTC CCT GGG GCC CTG GC	2
	10	GGC GGG GGG AGC TTG TGG CAC AG	
5	11	TCA GCC CCA CAC CAT CTC CTT C	2
	12	CTG GGC CCC GCA CCC CTA ACC C	
6	13.1	TCG CTG GGA CTC GCT GCC TT	1
	14	TGT CCT GCC CAC TCC TCA GCC T	
7	15	TGG CTG ACC ACT GTC CCT CT	2
	16	CCC CAG GAC CCC AGC TGT CCA A	
8	17	GCT GGC AGT GGC CTG TGT GGA	2
	18	AAC AGT GAC CAA AAT GAC AGT GAC	
9	19	TGG CTC AGC AGG TGA CAG C	1
	20	TGG TGG CAG GTG GGC TAC T	
10	21	GCC TGG CAG ACG ATG TCC A	1
	22	CAA CTG CCT GAG GGG TTC T	
11	23	CTG TCC CCA CAC TTT CTC CT	1
	24	TGA GCT CCA GTC CCC TCC AG	
12	25	TGG CCA CTC ACA ATC TCC T	1
	26	GCC TTG ACA CCC TCC ACT A	
13	27	GGC ACA GGG AGG AGA AGT G	1
	28	CGG CAC CGC TGA TCA TGC A	

Exon	KCNQ1-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
14	29	CCA GGG CCA GGT GTG AAC TG	1
	30	TGG GCC CAG AGT AAC TGA CA	
15	31.1	CCC CCA GCC CTA CCA CCC	1
	32.1	GCA GGA GCT TCA CGT TCA CA	
16	33.1	TTC CCA CCA CTG ACT CTC T	1
	34.1	ACT CTT GGC CTC CCC TCT	

KCNQ1 Primer für PCR nach Splawski et al. 1998

Programm: **1** **KCNQ1**

95 °C 10'

**94 °C 10s**

**58 °C 20s**

**72 °C 20s**

x30

72 °C 5'

Programm: **2** **KCNQ1 3**

95 °C 10'

**94 °C 10s**

**64 °C 20s**

**72 °C 20s**

x5

94 °C 10s

62 °C 20s

72 °C 20s

x30

72 °C 5'

Tabelle 2.5: KCNJ2 Primer

Exon	KCNJ2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
2	1	CCA AAG CAG AAG CAC TGG AG	1
	2	CCA TGG AGC AGA GCT ATC AA	
	3	ACG TGT GTG GAC ATT CGC TG	1
	4	CAA TCA CGG CAT TGT GAC TG	
	5	CAG TCA TGG CCA AGA TGG CA	1
	6	CAC TGT GTC GTC ATG GCA GT	
	7	GTG GTC ATA CTG GAA GGC AT	1
	8	CCA GAG AAG GAA TCA GTC AG	

Programm: **1** **KCNJ2**

95 °C 10'

**94 °C 10s**

**60 °C 20s**

**72 °C 2'**

x45

72 °C 7'

Tabelle 2.6: KCNE1 Primer

Exon	KCNE1-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
3	1	CTG CAG CAG TGG AAC CTT AAT G	1
	2	GTT CGA GTG CTC CAG CTT CTT G	
	3	GGG CAT CAT GCT GAG CTA CAT	1
	4	TTT AGC CAG TGG TGG GGT TCA	
	5	GTT CAG CAG GGT GGC AAC AT	1
	6	GCC AGA TGG TTT TCA ACG ACA	

Programm: **1**                      **KCNE1**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**58 °C 20s**

**72 °C 40s**

**x33**

72 °C 7'

Tabelle 2.7: KCNE2 Primer

Exon	KCNE2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
1	1	CCG TTT TCC TAA CCT TGT TCG	1
	2	AGC ATC AAC TTT GGC TTG GAG	
	3	GTC TTC CGA AGG ATT TTT ATT AC	1
	4	GTT CCC GTC TCT TGG ATT TCA	
	5	AAT GTT CTC TTT CAT CAT CGT G	1
	6	TGT CTG GAC GTC AGA TGT TAG	

Programm: **1**                      **KCNE2**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**56 °C 20s**

**72 °C 40s**

**x33**

72 °C 7'

Tabelle 2.8: RyR2 Primer

Exon	RyR2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
8	17	TTG TGT GTT GGG AAT CAT TG	1
	18	AGC AGA TAC ATG ATC CTA CTT T	
14	29	GGA AAA GAG ACG TTG GGA GT	1
	30	TGC ATA TCC AAT AAA GAA ATG AAA A	
15	31	GGG AGA GAG ATT AAT GCC TGA	1
	32	AAT TTT CCC AAC CAA GAA GC	



Exon	RyR2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
44	97	GTT ACA GCA CGA TCC AGG TT	1
	98	GAG AAA ACC GTG AAA AAG CA	
45	99	AAT GAG TTT TCA GCC AAG GG	1
	100	TTC CTT CAT GAA AGT GCT GAG	
46	101	TTT GTT TAC TTA TCT TCC CCA TTC	1
	102	TAT GGA TCA CTC GTG AGG GT	
47	103	GTC CCT TTC CTC GGA GAG AT	1
	104	GGT TTT GGA TGC TGT TAT GC	
49	107	ACA GCC ATT GAC ACC AAA AT	1
	108	AGA GAG GAG GAA GTC CAT CG	
83	177	AAT GGA AAG CCT GTT TTG GT	1
	178	AAC CAC TGA GTA GAA CCC CC	
88	187	TGA GGA ATA ATT GCC GTT TG	1
	188	AAT GAG CAA AAG AGG CAT GA	
90	191	ACA AAT GCA ACT GCT TTA CC	1
	192	TTT CAT TCT CAT CCG TCT CC	1
	193	GAG CCA TAA GCA CTA CAC GC	
	194	ATA GAC CCT CTC GAT GCG TT	1
	195	ATT AGC AGA GAG CGT CCT GA	
	196	TAT TCG CTG ACC TCT CGT TC	1
	197	GGA CAC CAT CTT TGA AAT GC	
	198	CAT GTC CTT CAC GGT CAT CT	1
	199	GAG CCT GAA GAA GCA GAT GA	
	200	TCC CCA TCT CCT CTA ACC TC	1
	201	AAC ATG CCA GAC CCC ACT	
	202	CAG AGA GAA TGC TGC TGT GAC	
93	207	AGG TTT CAA GCC TGT TGA TTC	1
	208	GCC TAG GCA CCA GTG TTT CA	
97	215	AAT GGT TGA AGC CAA CAA AA	1
	216	GGA AAG GAA ATC AAT GCA CA	
100	221	TTC TCA CTA GAG CAC TCG CC	1
	222	CTG CAG AAG CAG GAG ACA TT	
101	223	AAA ATG GGT AAT GTC CCT CC	1
	224	TCA GCT TCA GTG AGG AGG AT	
102	225	TGT ACA TCT CCC CTT TCC CT	1
	226	CCA GGA CAA AGA AGC TG	
103	227	AAC CAA ATA ATA GCT GCC CC	1
	228	CGT CTA CTG GAG AGG TGG AA	
105	231	GAC TTC TCT ATT CCG TGC GA	1
	232	GAG AGA GGG GTA GGG TTT TG	

Programm: 1

RyR2

95 °C 10'

94 °C 1'

60 °C 1'

72 °C 1'

72 °C 7'

x22

Tabelle 2.9: PKP2 Primer

Exon	PKP2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Ansatz
1	1	GTG GCG GCT TCG CCC GCG AG	2 5 % DMSO
	2	GAT AGG AGG AGG TGA CCG GGT G	
2	3	TTA ACG TAC GTT TAA TAC TTG TTC TTG GCC	1
	4	TGT TTC ACA TCC CTA GTT TTC CAT GGT ATC	
3	5	GTT GGG TAA TAG TCC CAG AGT AAT TAG TCC	1
	6	TAC TGT CTG TGG TAT GTG TCA AAG TGG CGC	
3	7	TCC TAG TGC CAC CGA GAT ATG CTC GTT CCG	2
	8	TCA CTT ATC TCT GGA AGC CCT TCT CTC AAG	
4	9	TCC CAG TAT TCG CTG AGT CG	1
	10	TGG GAA TAT AGG CGT GAA CC	
5	11	GGG TAT ATT CTA CAA GAG CCT CAG TTG TGC	1
	12	AGC CTT CTC TAG CAT AAC AAT GAG CCC ATC	
6	13.2	CAG CCA AGT CTG CCA CAT TTG CTG	1
	14.1	CTT GGC TCA CTG CAA CTT CTG CC	
7	15	TGG AGT TGA TGG CCT TGA CTG AAC	1
	16	ATC CTG ACT TCC TTG GGG CTA C	
8	17	ACT GGG CAA GTC TGC CAC AC	1
	18	ATG GAA GAT CTT AGG CTC AG	
9	19	TAC TCA TTG CAT TTC CCC CAG	1
	20	TCC TCA CTG GTA AAT GAG GG	
10	21	GGT CTC CTG GTT TGA GTG TG	1
	22	CTG AAT TGA ATG TAG GTA TGT C	
11	23	ACA TCT TCA TCA ACC TCT GGT AAT CTA CAG	1
	24	AGA AAG CCT GTT TGT GAT ATC TGG TGG CAC	
12	25.1	GAG CTT GCA GTG AGC CAA GAT GGT G	2
	26.1	CAA GCA TGT GGT GTG GTG GAT TC	
13 / 14	27	GAT ATG GTC CCC GCC TTG CAG	3
	28	GCA AAC TTG CAA AGG TCT TCT GG	

Tabelle 2.10: PKP2 Primer zur Sequenzierung

Exon	PKP2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )
11	24_SEQ	TAT CAC CTA CTC CTT ACT CC
12	25_SEQ	TGT AGC CAA AGA AAC TCT CC
	26_SEQ	TAC GCA TCG CCT GCA CTA ATG G

Seq bei 58°C

Programm: 1 hERG

95 °C 10'

94 °C 20s

58 °C 20s

72 °C 40s

72 °C 5'

x33

Programm: **2**                      **Herg64**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**64 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 7'

Programm: **3**                      **Herg62**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**62 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 7'

Tabelle 2.11: DSG2 Primer

Exon	DSG2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
1	1.2 2.3	CCAGGGAGGAGCCGAGTG CTAGACCTCGCCTACCGACGCC	1 (64 °C) 5 % DMSO
2	3 4	AGGAGTCAGTATGGATCCAGG ATTCAGCACCTCGTCATGGAC	2
3	5 6	TAGACAATGAAGCCTCATAGG CAATGATGCTGCATCTTCCGG	2
4	7 Ex4rev	ATCACTTCTTAGGCTTTTGGC CTTATTATGACAGAAAACTAC	1
4	7.2 Ex4rev	GGCTTTTGGCTAAGATCAAATC CTTATTATGACAGAAAACTAC	1
5	Ex5for 8.3	GTAGTTTTTCTGTCATAATAAG GACTCTTACGTGCTGCACTC	1
6	9 10	GGACTCTACCCTCAGCCTTGC TCCAAGAGTTATCCTATGG	1
7 + 8	11 12.1	TTCTGCAAAAGCTCTGACTGC CTCAAACAACCTGTAGTGCTAG	2
9	13 14	AGTTGGACTATTCAGTGCTGC TTTGGGGAACATAATGCTGG	2
10	15.2 16.4	GCTTGAAAGAGCTGTAGATG GCATGAGCCACTGCTCCCGGCCG	2
11	17.2 18.2	GGCAAGGGAATTCAAACATATGTC GCTTGGTACTCCTCACCTTACCAGAC	2
12	19 20	CAGCAATGAAAGAACATTTGTGG CAGTTGTTTCCCTATTACCC	2
13	21 22	GTGAAGACAAGTCCAGGAAGG CAAAGGCACATGAGTGAAATCC	1
14	23 24	AGCTTATACCTTCCTATGCCC AGTCTCATTTGGATCCAAGGC	2

Exon	DSG2-Primer	Sequenz ( 5' → 3' )	Programm
15.1	25.2 26.3	CAGTCCAGTTGTGTCGTAGG CTAGAAGCCATTGGGTCAGG	2
15.2	27.1 28.3	CCTGACCCAATGGCTTCTAG CCTTTGCATATCAGTGA CTG	2
15.3	29 30	CAAGTATGAACACAGCTTCAC CCATGAGGCTGTATTACTC	2

Programm: **1**                      **hERG 56**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**56 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 5'

Programm: **2**                      **hERG 58**

95 °C 10'

**94 °C 20s**

**58 °C 20s**

**72 °C 40s**

x33

72 °C 5'

Im Anschluss erfolgte zur Kontrolle eine Agarose-Gelelektrophorese für ca. 15 Minuten bei 120 mV.

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Trennverfahren, bei dem Moleküle nach Größe und Ladung im elektrischen Spannungsfeld aufgetrennt werden. Die Agarose stellt dabei ein molekulares Sieb dar.

Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur positiven Anode. Die Wandergeschwindigkeit hängt unter anderem von der Größe und Konformation der jeweiligen DNA-Moleküle, aber auch von der Konzentration und Art des Agarosegels und der angelegten Spannung ab.

Um die DNA in dem Gel später sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in die DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert.

Die PCR-Proben werden vor dem Auftragen auf das Gel mit Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer beschwert die Proben und zeigt die Lauffront während der Elektrophorese an. Mittels eines Längenstandards lässt sich die jeweilige Größe der DNA-Probe bestimmen.

#### Durchführung:

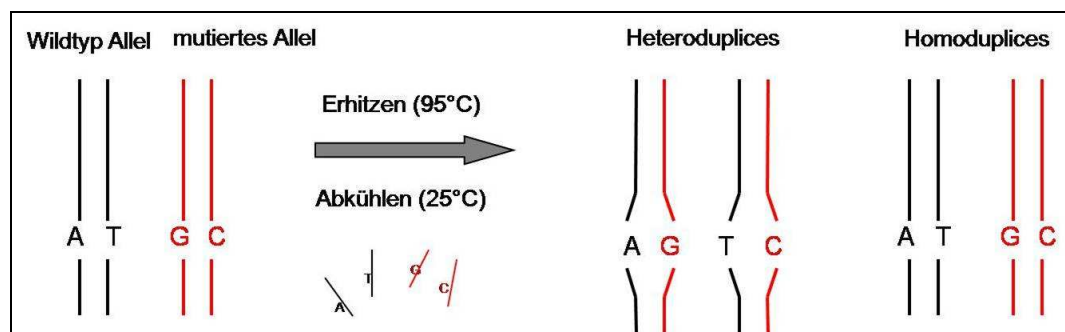
Herstellung eines 2,5 %igen Agarosegels:

- 3,75 g Agarose in 150 ml 1x TBE-Puffer
- Erhitzen des Gemischs in der Mikrowelle bei Stufe II, bis die Agarose vollständig gelöst ist
- Zugabe von 30 µl Ethidiumbromid
- Die Lösung wird in einen zuvor vorbereiteten Gelschlitten mit Kämmen gegossen. Die Kämmen bewirken Vertiefungen im Gel (Auftrageaschen) zum Auftragen der Proben. Die Agarose polymerisiert beim Abkühlen.
- Nach dem Abkühlen werden die Kämmen vorsichtig entfernt, und das Gel in die Elektrophoresekammer (Sub Cell Model 192, Fa. Bio-Rad, München) gefüllt mit 1x TBE-Puffer, gegeben
- Probenvorbereitung: 4 µl PCR-Probe + 2 µl Ladepuffer
- Neben den Proben wird ein 100 bp Längenstandard mit auf das Gel aufgetragen
- Die Laufzeit beträgt ca. 15 Minuten bei 120 mV

Anschließend wird das Gel auf einem UV-Tisch analysiert und in einer Gel-Dokumentations-Kammer fotografiert (Fa. Biometra, Göttingen).

## 2.2.4 Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC)

Eine Methode zur Mutationsdetektion ist die sogenannte DHPLC (denaturing high-performance liquid chromatography), die erstmals 1995 von Oefner & Underhill beschrieben wurde. Die Grundlage dieser Technik liegt in der Unterscheidung von Homo- und Heteroduplices in einem PCR Produkt zweier chromosomaler Fragmente.

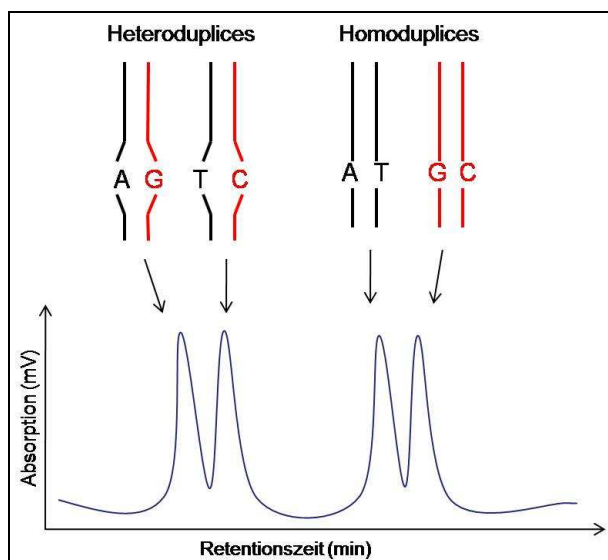


**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Hetero- und Homoduplices eines heterozygoten Anlagenträgers.

Der charakteristische Schritt dieser Methode ist die anfängliche Denaturierung des PCR Produktes bei 95 °C. Hierbei werden die Doppelstränge beider Allele getrennt. Während des anschließenden Abkühlens auf 25 °C können sich die Einzelstränge wieder beliebig anlagern. Trägt eines der beiden Allele eine Mutation, bzw. weichen beide Sequenzen an einer bestimmten Stelle voneinander ab, bilden sich sogenannte Heteroduplices mit Basenpaarung außerhalb des Watson-Crick-Systems. Neben den Heteroduplices bilden sich in gleicher Menge Homoduplices, bei welchen alle Basen zueinander komplementär sind (Abb 2.1).

Als nachfolgenden Schritt erfolgt die chromatographische Auftrennung. Die entstandenen Heteroduplices werden aufgrund ihrer veränderten physikalischen Eigenschaften der Doppelstrang-DNA mit Hilfe einer hochauflösenden Polymermatrix von den Homoduplices getrennt. Dies geschieht mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie. Die stationäre Phase bilden alkylierte, hydrophobe Polystyren-Divinylbenzol Partikel, während in der mobilen Phase das amphiphile Molekül TEAA (Triethylammoniumacetat) die Funktion des

„Brückenmoleküls“ übernimmt. Mit seiner freien positiven Ladung interagiert das TEAA mit der entsprechenden freien Ladung der Phosphatgruppen der DNA auf der einen Seite, während es auf seiner anderen Seite mit seinen freien Alkylketten spezifisch an die hydrophobe Säulenmatrix bindet. Durch eine kontinuierlich steigende Acetonitrilkonzentration werden die DNA-Moleküle unter Hochdruck von der Säule gewaschen. Aufgrund des Basen-Mismatches der Heteroduplices haben diese Fragmente eine geringere Affinität zur Säule und werden während der mobilen Phase entsprechend früher von der Säule gewaschen. Die Homoduplices binden stärker an die Säule und werden somit auch später von der Säule gelöst. Nach Austritt aus der Säule werden die Fragmente von einem UV-Detektor (254 nm) erfasst und von der systemeigenen Software verarbeitet. Das entsprechende Chromatogramm zeigt nach Durchlaufen des Standards vier Peaks (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2: Homo- und Heteroduplices im Chromatogramm.**

Der Unterschied der Retentionszeiten ist meist so gering, dass er von dem Detektor nicht erfasst wird. In der Mehrzahl der Fälle zeigt das Chromatogramm bei heterozygoten Anlageträgern zwei Peaks - der erste Peak verursacht durch die thermolabilen Heteroduplices und der zweite durch die Homoduplices.

Bei homozygoten Anlageträgern können sich keine Heteroduplices bilden. In diesem Fall entstehen identische Homoduplices, die im Chromatogramm als ein

homogener Peak dargestellt werden. Durch Zugabe einer Wildtyp-DNA im Verhältnis 1:1 lässt sich eine Mutation jedoch darstellen.

Tabelle 2.12 zeigt die dHPLC Bedingungen der untersuchten Gene und Exons. Es wurden zunächst nur die Gene und Exons untersucht, die neue Sequenzvarianten aufwiesen.

Gen	Exon	Mutation	Temp (°C)	%A	%B
<i>SCN5A</i>	20	A1186T	66,0	45,7	54,3
<i>KCNH2</i>	2	L69P	65,0	44,9	55,1
<i>RyR2</i>	14	R420Q	59,7	47,7	52,3
	90e	V4299M	59,7	46,8	53,2
	105	Y4944C	57,1	47,0	53,0
<i>DSG2</i>	3	R49C	56,0	41,6	58,4
	10	D441V	56,0	44,1	55,9
	14	A738T	57,0	41,0	59,0
<i>PKP2</i>	3	W123X	63,0	42,7	57,3
	4	E380X	61,0	43,6	56,4
	4	R388W	61,0	43,6	56,4
	12	Splicesite	60,0	41,0	59,0

**Tabelle 2.12: Übersicht über die untersuchten Gene und Exons mittels dHPLC.**

#### Durchführung:

Nach der PCR werden die Proben in ein dHPLC geeignetes Reaktionsgefäß (0,2 mL Thermo-Strip, Fa. ABgene) überführt und im Thermocycler denaturiert. In dem Programm Heteroduplex wird zunächst 10 Minuten bei 96°C denaturiert und im Anschluss 10 Minuten bei 55 °C renaturiert. Diese Tubes werden in den Autosampler gestellt und mit Hilfe der Navigator Software verlinkt. Die Software ist entsprechend voreingestellt, so dass 8 µL der Probe aufgezogen werden.



### 2.2.5 Sequenzierung

Die Nukleotidsequenzierung ermittelt die exakte Basenabfolge in einem DNA-Strang. Das hier verwendete Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger ist eine von mehreren Sequenzierungsmethoden:

Der zu sequenzierende DNA-Doppelstrang dient als Matrize für die Polymerase zur Synthese des Komplementärstrangs. Es wird dem Sequenzansatz nur ein Primer zugegeben, wodurch man ein lineares, einzelsträngiges Amplifikat erhält.

Neben den Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) werden in einem entsprechenden Verhältnis Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTPs) hinzugegeben. Den ddNTPs fehlt die 3'OH-Gruppe, so dass es nach Einbau in den komplementären Strang zu einem Kettenabbruch kommt.

Da die ddNTPs an jeder Stelle eingebaut werden können, erhält man am Ende der Sequenzierung DNA-Fragmente in vielen möglichen Längen. Zusätzlich sind die ddNTP's mit vier unterschiedlich fluoreszierenden Farben (Dye Terminatoren) markiert, so dass jeder Base eine Farbe zukommt. Anschließend werden die DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese größenspezifisch aufgetrennt und mit einem Argon-Laser zur Emission angeregt. Eine CDD-Kamera dokumentiert jede einzelne Base, deren Reihung die genaue Basenabfolge des DNA-Bruchstücks ergibt.

#### 2.2.5.1 Herstellung des Sequenzieransatzes

1,5 µl	Big Dye ®Terminator Ready Reaction Mix
2,5 µl	Big Dye ®Terminator Sequencing Puffer (5x)
1 µl	Primer (10 µM)
1 µl	PCR-Produkt
ad 20 µl	dest.H <sub>2</sub> O

Gemisch im Thermocycler (Fa. Biometra, Göttingen) bei folgenden Bedingungen inkubiert:

30 Zyklen:	Denaturierung	96 °C 10 Sekunden
	Annealing	50 °C 5 Sekunden
	Extension	55 °C 4 Minuten

### **2.2.5.2 Aufreinigung des Sequenzieransatzes**

Nach erfolgter Amplifikation des Sequenzieransatzes werden die Sequenzproben aufgereinigt. Nicht eingebaute ddNTP's werden in der folgenden Aufreinigung (DyeEx 2.0 Spin Kit for Terminator Removal, Fa.Qiagen) entfernt. Die Säulen bestehen aus einer Gelmatrix, die niedermolekulare Substanzen (< 50 bp) absorbiert und somit unspezifische Signale während der Sequenzierung verhindert.

- Säulen kurz vortexen
- Deckel um eine viertel Drehung öffnen
- Verschluss entfernen
- Säulen in Reaktionsgefäß stellen
- 3 Minuten bei 2.800 rpm zentrifugieren
- Reaktionsgefäß mit Eluat verwerfen
- Säulen in ein neues Reaktionsgefäß stellen
- Volumen des Sequenzieransatzes in die Mitte der Säulenmatrix pipettieren
- 3 Minuten bei 2.800 rpm zentrifugieren
- Säulen verwerfen
- Eluat enthält den gereinigten Sequenzieransatz

Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Zentrifuge Biofuge Pico 17, Fa. Hereaus durchgeführt.

### **2.2.5.3 Vorbereitung der Sequenzierung**

- 10 µl des Eluats in eine Vertiefung einer 96-well-Platte geben
- 4 µl HPLC H<sub>2</sub>O hinzu pipettieren
- 2 Minuten bei 96°C im Thermocycler (Fa. Bio-Rad, München) denaturieren

Einsetzen der Platte in das Sequenziergerät (ABI 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems, Weiterstadt).

Sequenzierprogramm:

Polymer:	POP-4TM Polymer
Run-module:	UltraSeq_POP4Default Module
Mobility File:	DT3130POP4(BDv3)v1.mob
Dye/Filter Set:	E

#### **2.2.5.4 Sequenzanalyse**

Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm 'SeqScape Version 2.5' der Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt.

Hierbei können die ermittelten Sequenzen untereinander und mit einer Referenzsequenz (Wildtyp-Sequenz) verglichen werden. Es wurden folgende Referenzsequenzen mit folgendem Identifikations-Code des NCBI (National Center of Biotechnology) verwendet und verglichen:

hERG:	NC_000007.12
SCN5A:	NC_000003.10
KCNQ1:	AJ006345.1
KCNJ2:	NC_000017.9
KCNE1:	NC_000021.7
KCNE2:	NC_000021.8
RyR2:	NC_000001.9
PKP2:	NC_000012.10
DSG2:	NC_000018.8

### 2.2.6 TA-Klonierung

Ziel der Klonierung ist die Einführung eines DNA-Fragments in einen Vektor, der die Vermehrung dieses DNA-Fragments ermöglicht.

Die TA-Klonierung ist eine Variante der klassischen Klonierung. Die in der vorangegangenen PCR verwendete Taq-Polymerase produziert am 3'-Ende des PCR-Fragments eine oligo d(A)-Sequenz. Dieses Fragment wird mit einem Vektor mit Thymin-Überhang am 3'-Ende ligiert, wobei eine kovalente Verknüpfung entsteht (Vektorkarte s. Anhang).

Die Klonierung setzt sich aus den folgenden Schritten zusammen:

Ligation, Transformation/Selektion und Isolation der Plasmid-DNA.

#### 2.2.6.1 Ligation

In diesem Schritt wird das Insert (DNA-Fragment) mit dem Vektor über Phosphodiesterbindungen vereint. Dieser Vorgang wird von der T4-Ligase, einem Enzym, welches aus dem Bakteriophagen T4 isoliert wurde, katalysiert.

##### Durchführung:

- pGEM-T-Vektor kurz anzentrifugieren
- 2x Rapid-Ligations-Puffer vortexen (nach dem ersten Gebrauch aliquotieren)
- Herstellung des Ligationsansatzes auf Eis:

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}$
PCR-Produkt	2
2x Rapid-Ligations-Puffer	5
pGEM-T Vektor	1
T4-DNA-Ligase (3 U/ $\mu\text{l}$ )	1
Aqua <sub>dest</sub>	ad 10

- Ansatz durch Pipettieren mischen
- Inkubation über Nacht bei 4 °C

Ligationsansätze werden nach Inkubation direkt in die Transformation eingesetzt oder zur Aufbewahrung bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.6.2 Transformation und Selektion

Unter Transformation versteht man die genetische Veränderung einer Zelle durch Aufnahme freier DNA aus dem Lebensraum. Bakterien, die dazu fähig sind, werden als kompetente Zellen bezeichnet und können auf diesem Weg einen Selektionsvorteil in der Natur erlangen. Bei vielen Bakterien (z.B. *E.coli*) kann die Transformation im Labor (in vitro) ausgelöst werden. Die Methode hierzu ist eine kurze Hitze-Inkubation. Im Anschluss daran muss kontrolliert werden, ob a) die Bakterien das Plasmid aufgenommen haben, und b) das Insert in den Vektor eingebracht wurde. Hierzu verwendet man LB-Agarplatten, die mit folgenden Substanzen versehen sind:

**Ampicillin (Amp):** der Vektor trägt ein Resistenzgen für Ampicillin. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, besitzen die Fähigkeit auf den LB-Amp-Agarplatten zu wachsen.

**Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG)** und **5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal):** die verwendeten, kompetenten *E.coli* – Bakterien können das lacZ-Gen nicht mehr exprimieren, können aber durch den pGEM-T-Vektor, der das lacZ-Gen besitzt, komplementiert werden ( $\alpha$ -Komplementierung).

IPTG wirkt als Induktor für das lac-Operon, X-Gal ist das chromogene Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase. Bakterien, die den Vektor ohne Insert aufgenommen haben, exprimieren die  $\beta$ -Galaktosidase, die das Substrat X-Gal in eine unlösliche, blaue Komponente konvertiert. Die Kolonien erscheinen blau.

Bakterien, die den Vektor mit Insert aufgenommen haben, können keine  $\beta$ -Galaktosidase synthetisieren, da die Schnittstelle für das Insert im lacZ-Operon liegt. Diese Kolonien erscheinen auf der Agarplatte weiß.

#### Durchführung:

- 100  $\mu$ l kompetente Zellen auf Eiswasser auftauen (JM109 High Efficiency Competent Cells (*E.coli*))
- Zugabe des Ligationsansatzes
- Mischen durch Anschnicken
- Inkubation für 20 Minuten auf Eis
- Hitzeschock: 45 Sekunden im Wasserbad (Fa. GFL) bei 42 °C
- Sofortige Lagerung auf Eis für 2 Minuten
- Zugabe von 900  $\mu$ l LB-Medium (Raumtemperatur)
- Inkubation für 1,5 Stunden bei 37 °C schüttelnd (Incubator Shaker G 25, Fa. New Brunswick Scientific)
- Zellen pelletieren durch kurzes (ca. 15 sec) Zentrifugieren (Biofuge Pico, Fa. Heraeus)
- 700  $\mu$ l Medium abziehen und verwerfen
- Zellpellet in den restlichen 300  $\mu$ l auflösen
- Ausplattieren: jeweils 100  $\mu$ l und 200  $\mu$ l auf IPTG-X-Gal-Amp-Agarplatten
- Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (BE 800, Fa. Memmert)
- Nach Inkubation 1-2 Stunden bei 4 °C inkubieren (fördert die Blau-Weiß-Selektion)
- Isolation der Plasmid-DNA

### 2.2.6.3 Isolation

Um die Plasmid-DNA aus den *E.coli*-Übernachtskulturen zu gewinnen, wird das QIAprep Spin Miniprep-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet. Dies ermöglicht eine Aufreinigung von bis zu 20 µg high-copy Plasmid-DNA.

#### Durchführung:

- 12 weiße Klone picken
- Einen Klon in 3 ml LB-Amp-Medium animpfen
- Über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubieren
- 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in 250 µl P1-Puffer resuspendieren
- Zugabe von 250 µl P2-Puffer und anschließend Tube 4x invertieren
- Maximal 5 Minuten inkubieren
- 350 µl N3-Puffer hinzufügen und Tube 4x invertieren
- 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in QIAprep-Spin Säule überführen
- 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren
- Eluat verwerfen
- 1. Waschschrift:      0,5 ml PB-Puffer auf die Säule geben  
                                 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren  
                                 Eluat verwerfen
- 2. Waschschrift:      0,75 ml PE-Puffer auf die Säule geben  
                                 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren  
                                 Eluat verwerfen
- 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren, um den restlichen Puffer zu entfernen
- Eluat verwerfen

- QIAprep-Spin Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen
- Elution der DNA: 50 µl EB-Puffer zugeben  
Inkubation für 1 Minute bei Raumtemperatur  
1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugieren
- DNA bei -20 °C lagern oder direkt für PCR-Reaktion einsetzen

Alle Zentrifugationsschritte wurden in der Zentrifuge Biofuge Pico 17, Fa. Hereaus durchgeführt.

### 2.2.7 QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenese

Die QuickChange® II XL Site-directed Mutagenese Methode dient dem Generieren von Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen einzelner Nukleotide. Als Ausgangsmaterial für die Reaktion dienen ein dsDNA Plasmid, welches die zu mutierende DNA enthält und 2 synthetische Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation tragen. Diese Oligonukleotide sind komplementär zu beiden Strängen in einem definierten Bereich der Insert-DNA. Eine *proofreading* Polymerase sorgt für eine sehr genaue Verlängerung der DNA und für ein vollständig synthetisiertes Plasmid mit der gewünschten Mutation. Zum Entfernen des Template-Plasmids wird am Ende der Reaktion mit dem Enzym *Dpn I* verdaut, wodurch gezielt die methylierte Ausgangs-DNA abgebaut wird.

#### Durchführung:

10x reaction buffer	5 µL
Template DNA	10 ng
Primer Hin	1,25 µL
Primer Rück	1,25 µL
DNTP Mix	1 µL
Quick Solution	3 µL
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µL
+ 1 µL <i>PfuUltra</i> HF DNA polymerase	



Es ist darauf zu achten, dass bei der folgenden PCR die Elongationszeit von der Größe des Plasmids abhängig ist.

PCR Parameter:

- |    |       |                            |
|----|-------|----------------------------|
| 1. | 95 °C | 1 Minute                   |
| 2. | 95 °C | 50 Sekunden                |
|    | 60 °C | 50 Sekunden                |
|    | 68 °C | 1 Minute / kb Plasmidlänge |
| 3. | 68 °C | 7 Minuten                  |

Schritt 2 wird in 18 Zyklen wiederholt.

Im Anschluss erfolgt der Verdau mit 1 µl *Dpn I* für eine Stunde bei 37 °C.

Die neu-synthetisierte DNA, die die gewünschte Mutation enthält, wird wie folgt in XL10-Gold E.coli ultrakompetente Zellen transformiert:

- Zellen auf Eis auftauen
- Pro Ansatz 45 µl Zellen in vorgekühltes 14 mL Falcon Tube
- 2 µl β-ME dazugeben
- Vorsichtig mischen
- Zellen auf Eis 10 Minuten inkubieren und alle 2 Minuten mischen
- 2 µl *Dpn I* – DNA zu den Zellen dazugeben
- Alle Ansätze vorsichtig mischen und 30 Minuten auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: 42 °C für 30 Sekunden
- Sofort für 2 Minuten auf Eis
- 500 µl, auf 42 °C vorgewärmtes, NZY<sup>+</sup> Medium in Falcon Tube dazugeben
- Schüttel-Inkubation 1 Stunde bei 37 °C und 225 – 250 rpm
- 250 µl des Ansatzes auf Agarplatte ausplattieren
- Platten bei 37 °C für > 16 Stunden inkubieren

Nach der 16-stündigen Inkubation erfolgt die Isolation der Plasmid-DNA wie in Punkt 2.2.6.3 beschrieben.

### 2.2.8 RNA Synthese

Eine beliebte Methode zum Funktionsnachweis eines mutierten Ionenkanals ist die elektrophysiologische Untersuchung im Oozytenexpressionssystem. Um die nachgebaute Mutante an *Xenopus*-Oozyten zu testen, muss zunächst die mutierte Ionenkanal-DNA in RNA umgewandelt werden, damit der Ionenkanal in den *Xenopus*-Oozyten exprimiert werden kann. Es gibt zwei Möglichkeiten zur Expression von Membranproteinen in *Xenopus*-Oozyten. Zum einen kann die genetische Information in Form von DNA direkt in den Zellkern der Oozyte injiziert werden, zum andern kann unter Umgehung der Transkription mRNA in die Oozyte injiziert werden. Translation und posttranslationale Modifikation bleiben in ihrem Ablauf unverändert. In der sogenannten in-vitro-Transkription wird die benötigte mRNA als Copy-RNA (cRNA) aus klonierter DNA gewonnen.

#### Linearisierung der DNA

Die Plasmid DNA muss zunächst linearisiert werden. Im Fall des SCN5A Gen, welches im pSP64T Vektor enthalten ist, wird über Nacht mit dem Enzym XbaI wie folgt verdaut:

DNA	5 µg
Puffer	5 µl
BSA	0,5 µl
XbaI	200 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Nach der 16 stündigen Inkubation erfolgt eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 Minuten. Die anschließende RNA Synthese wird mithilfe des mMESSAGE mMACHINE ® Kit durchgeführt.

Im Fall des KCNH2 Gens, welches ebenfalls im pSP64 Vektor enthalten ist, wird über Nacht mit dem Enzym EcoR1 verdaut:

DNA	5 µg
Puffer	5 µl
EcoR1	200 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Der Verdau wird anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

#### Aufreinigung der enzymatischen Reaktion

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei 10.000x g in der Heraeus Pico 17 Zentrifuge.

- 300 µl ERC Puffer auf den enzymatischen Reaktionsansatz geben und mischen
- Farbe kontrollieren – sie sollte gelb sein. Falls orange oder violett, dann muss 10 µl 3M Natriumacetat hinzugefügt werden.
- Das gesamte Volumen auf die MinElute Säulen geben und für 1 Minute zentrifugieren.
- Eluat verwerfen
- Waschschrift erfolgt mit 750 µl PE Puffer
- 1 Minute zentrifugieren
- Eluat verwerfen und anschließend erneut 1 Minute zentrifugieren
- Säule in eine frisches Eppendorf-Gefäß geben
- 10 µl EB Puffer auf die Membran geben und 1 Minute einwirken lassen
- Zentrifugation für 1 Minute

#### RNA Synthese

Die folgenden Pipettierschritte erfolgen auf Eis:

Template-DNA	1 µg
2x NTP/CAP	10 µl
10x Puffer	2 µl
GTP	1 µl
Enzym-Mix	2 µl
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Im Anschluss erfolgt eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C. Während dieser Zeit wird die Template-DNA mit den erforderlichen Nukleotiden (ATP, CTP, GTP und

UTP), der spezifischen RNA-Startsequenz [m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G] und des Enzyms SP6 RNA-Polymerase inkubiert. Da die SP6 Reaktion etwas langsamer als die T7 oder T3 Reaktion verläuft, wird die Inkubationszeit auf 2 Stunden verdoppelt, desweiteren handelt es sich um eine sehr lange Template-DNA, wodurch die Menge an GTP erhöht wird.

Zur Beendigung der RNA Synthese wird die Reaktion mit 1 µl des Enzyms TURBO DNase gestoppt. Nach 15 Minuten bei 37 °C ist die komplette Template-DNA abgebaut.

#### Aufreinigung der cRNA

Die gewonnene cRNA wird in den nachfolgenden Schritten von niedermolekularen Substanzen gereinigt. Alle Zentrifugationsschritte bei 13.000 rpm und 4 °C (Multifuge 1 L-R, Fa. Heraeus)

- Zugabe von 15 µl Ammonium Acetat
- Zugabe von 115 µl Nuklease-freiem Wasser
- Zugabe von 150 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
- Vortexen und 4 Minuten zentrifugieren
- Oberer Phase in ein neues Schraubdeckelgefäß überführen
- Zugabe von 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol
- Vortexen und 4 Minuten zentrifugieren
- Oberer Phase in ein neues Schraubdeckelgefäß überführen
- Zugabe von 150 µl 100 % Ethanol
- Inkubation über Nacht bei -80 °C
- 10 Minuten zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Auf das Pellet 200 µl 70 % Ethanol hinzugeben
- 4 Minuten zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 200 µl 100 % Ethanol

- 4 Minuten zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet trocknen lassen
- 27 µl RNase freies Wasser hinzugeben

Die gewonnene cRNA kann bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

### **2.2.9 Elektrophysiologie an Oozyten**

#### Präparation von Oozyten:

Die im frisch entnommenen Ovar enthaltenen Oozyten wurden mittels einer in Antibiotikum-haltigen ND96 (1x) gelösten Kollagenase Typ IA (0,5 mg/ml) über Nacht bzw. bei einer höheren Kollagenasekonzentration (2 mg/ml) für 2-3 h vereinzelt. Die Follikelzellen wurden nun durch Waschen mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Lösung vollständig von den Oozyten abgetrennt und entfernt. Unter dem Binokular (Fa. Nikon) wurden geeignete Oozyten für die spätere Injektion von cRNA ausgesucht. Als geeignet gelten Oozyten, die eine gleichmäßige Färbung des animalen und des vegetativen Pols aufweisen, deren Trennlinie zwischen den beiden Polen scharf ist und bei denen keine Anzeichen für ein Austreten des Zellkerns vorliegen. Bis zur Injektion wurden die Oozyten bei 4-10 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

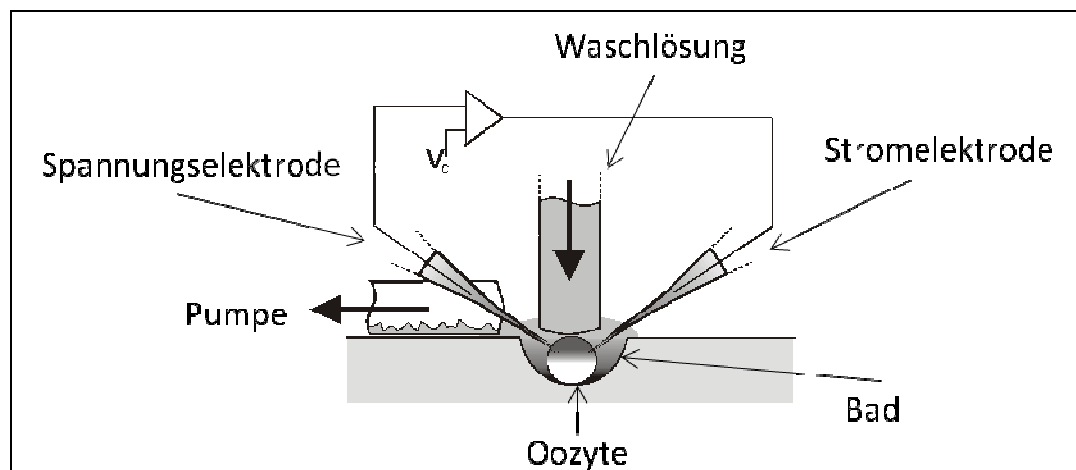
#### Injektion der cRNA in Oozyten:

Die Injektionskapillaren (Fa. Drummond) wurden mit einem Zweistufen-Vertikalelektroden-Puller (Fa. Narishige) hergestellt. Der Durchmesser der Kapillarenspitze wurde unter dem Binokular nachgeprüft und bei Bedarf auf 6-10 µm korrigiert. Die Injektion der cRNA erfolgt mit Hilfe eines Mikromanipulators (Fa. Bachofer) unter dem Binokular. Zuerst wurde die Injektionskapillare mit Immersionsöl luftblasenfrei gefüllt, womit die Injektion einer definierten Menge an RNA erreicht werden soll. Danach wurde die Kapillare an der Halterung des Mikromanipulators befestigt und ca. 1 µl cRNA durch Anlegen eines Unterdruckes aufgesaugt. Die Oozyten wurden in einer Plexiglasrinne aufgereiht und mit der Kapillare eingestochen. Durch das Anlegen eines leichten Überdruckes wurden jeder Oozyte 50 nl einer cRNA-Lösung injiziert. Für die

anschließende elektrophysiologische Untersuchung wurden die Oozyten nun je nach Bedarf für 1-3 Tage bei 18 °C inkubiert.

Die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Two Elektrode Voltage Clamp):

Das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen ändert den Fluss von Ionen und damit die elektrische Spannung über der Zellmembran. Zur Bestimmung dieser Membranströme, die durch die Veränderung der Kanalaktivität ausgelöst werden, wird die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme verwendet. Dabei werden zwei Glaselektroden in die Zelle eingestochen, von denen eine zur Ableitung und die andere zur Stromeinleitung dient. Die beiden Elektroden sind elektrisch so miteinander gekoppelt, dass eine Abweichung des Membranpotenzials von seinem Sollwert sofort einen Stromstoß auslöst, der das Membranpotenzial auf den Sollwert zurücksetzt (klemmt). Dieser Strom kompensiert somit die Ionenströme über der Zellmembran und dient als Messgröße.



**Abb. 2.3.: Das Messsystem.** Die Xenopus-Oozyte befindet sich in einem Bad und wird von den beiden Messelektroden angestochen. Über einen Zufluss wird die Oozyte von Waschlösung umspült. Eine Pumpe sorgt für den Abfluss der Lösung, damit das Bad nicht überläuft (verändert nach Goldin 2006)

Für die Voltage Clamp Messung wurde die Oozyte in die dafür vorgesehene Vertiefung im Bad platziert und mittels Mikromanipulator nun die Spannungs- und die Stromelektrode in die Zelloberfläche eingestochen. Danach wurde die Spülung mit der Messlösung angeschaltet, und das Haltepotential von -70 mV angelegt. Die erhaltenen Messdaten wurden mittels Clampfit am PC ausgewertet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Genetisches Screening bei Patienten und Verstorbenen**

Im Institut für Rechtsmedizin Frankfurt wurden Herzblutproben von Verstorbenen, deren Obduktion keinen Hinweis auf die Todesursache ergab, asserviert und nach Einwilligung der Hinterbliebenen molekularbiologisch untersucht.

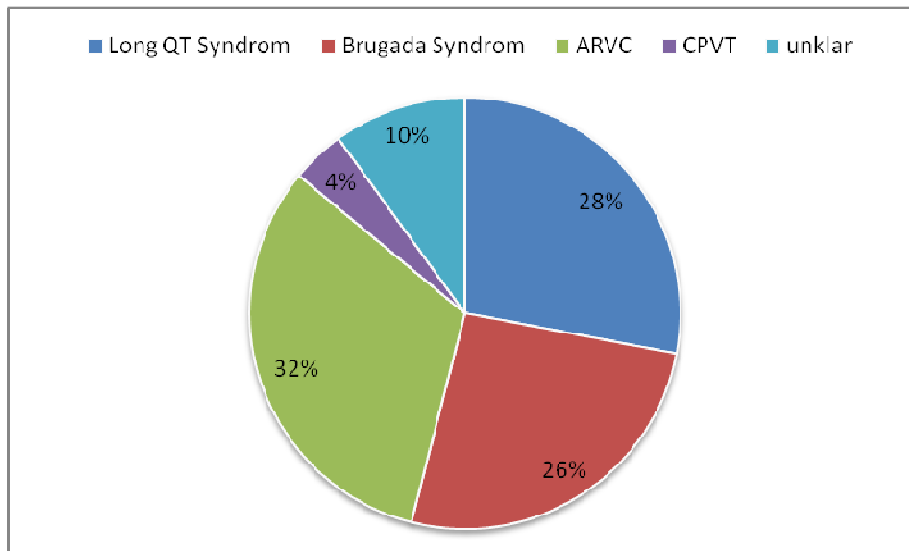
In Kooperation mit der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim wurden Blutproben von Patienten mit Herzerkrankungen und die sich wegen Herzrhythmusstörungen in Behandlung befinden ebenfalls einer genetischen Untersuchung unterzogen. Je nach Schwere der Erkrankung sind einige dieser Patienten bereits Träger eines implantierten Cardioverter-Defibrillators (ICD).

#### **3.2 Patienten mit diagnostizierten Herzerkrankungen**

Durch die vorangegangene klinische Untersuchung konnten die Patienten in den meisten Fällen einem Krankheitsbild zugeordnet werden. In einigen Fällen war die klinische Diagnose unklar, so dass man sich Aufschluss durch die molekulare Analyse erhoffte. Manche Patienten hatten bestimmte Symptome, die auf ein spezielles Syndrom hindeuteten. So wurden z.B. Patienten mit Verdacht auf Long QT Syndrom (LQTS) bei der Probeneinteilung in die Gruppe der LQTS Patienten eingegliedert. Das Gleiche galt für die anderen Krankheiten. Insgesamt wurden 50 Patienten untersucht (Abb. 3.1). 14 Patienten litten am Long QT Syndrom (28%), 13 Patienten an Brugada Syndrom (26%), 16 Patienten hatten ARVC (32 %) und zwei Patienten CPVT (4%). Bei fünf Patienten war die Diagnose unklar (10%).

Bei sechs der 14 Long QT Syndrom Patienten konnten Mutationen in fünf verschiedenen Genen detektiert werden. Bei einer weiteren Patientin konnten gleich zwei Mutationen in zwei Genen (*RyR2* und *PKP2*) nachgewiesen werden. Bei den anderen fünf Patienten wurde jeweils eine Mutation gefunden.

Innerhalb der 13 Brugada Syndrom Patienten konnten bei vier Patienten Mutationen in zwei unterschiedlichen Genen nachgewiesen werden. Zwei Mutationen wurden im *SCN5A* Gen und zwei Mutationen im *KCNH2* Gen detektiert.



**Abb. 3.1.: Prozentuale Verteilung der Diagnosen des Patientenkollektivs der Kerckhoff Klinik.** Insgesamt wurden 50 Patienten untersucht.

Von 16 ARVD Patienten wurden bei 10 Patienten Mutationen in zwei Genen (*DSG2* und *PKP2*) nachgewiesen. Bei zwei Patienten konnten in beiden untersuchten ARVC assoziierten Genen Mutationen detektiert werden, während bei den übrigen Patienten Mutationen in den *PKP2*- oder *DSG2* Genen gefunden wurden.

Bei zwei CPVT Patienten wurde das *RyR2* Gen untersucht, jedoch konnte in beiden Fällen keine Mutation nachgewiesen werden.

Ein Teil der nachgewiesenen Mutationen war bereits beschrieben und auch mit den jeweiligen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht worden. Darüber hinaus konnten aber auch einige neue Mutationen gefunden werden, die in Tabelle (Tab. 3.1) aufgelistet sind.



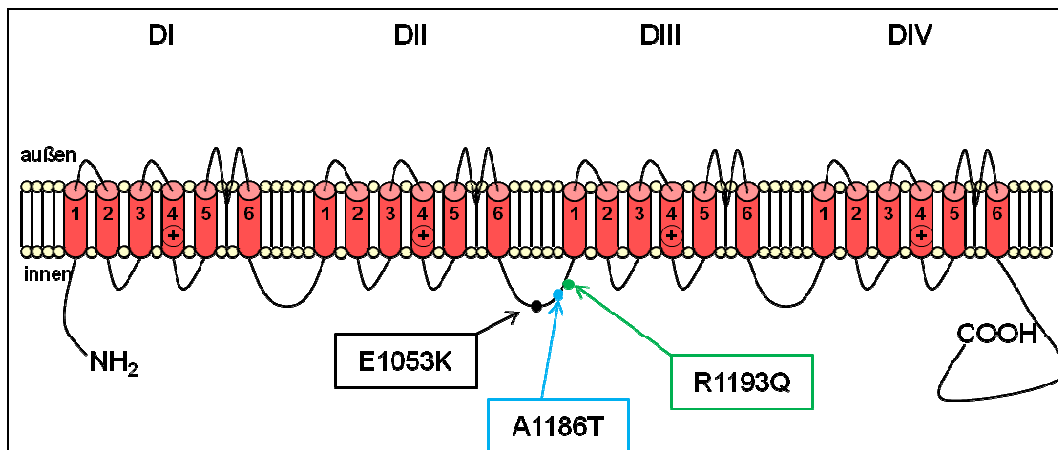
In folgender Tabelle sind auch die mit ARVC assoziierten Gene *DSG2* und *PKP2* enthalten. Die Ergebnisse wurden im Institut für Rechtsmedizin Frankfurt im Rahmen zweier Diplomarbeiten erzielt. Der Vollständigkeit halber sind diese Ergebnisse ebenfalls dargestellt.

Gen	Exon	Mutation	Status	Probennummer
<i>SCN5A</i>	20	R1193Q	bekannt	BN003
	17	E1053K	bekannt	BN004
	20	A1186T	neu	BN035
<i>KCNH2</i>	2	L69P	neu	BN005
	13	R1047L	bekannt	BN012
	11	R883W	neu	BN046
<i>KCNQ1</i>	8	R366Q	bekannt	BN018
<i>RyR2</i>	90	V4299M	neu	BN017
	14	R420Q	neu	BN027
	105	Y4944C	neu	BN046
<i>DSG2</i>	3	V55M	bekannt	BN034
	8	T335A	bekannt	BN008
	10	D441V	neu	BN030
	3	R49C	neu	BN044
	14	A738T	neu	BN049
<i>PKP2</i>	11	Q726X	bekannt	BN006
	1	M1V	bekannt	BN008
	12	Splicesite	neu	BN017
	3	W123X	neu	BN034
	4	R388W	neu	BN043
	4	E380X	neu	BN045

**Tab. 3.1.: Übersicht über die nachgewiesenen Mutationen innerhalb des Patientenkollektivs der Kerckhoff Klinik.** Es wurden sowohl bekannte, als auch neue Mutationen gefunden.

### 3.2.1 Untersuchung des *SCN5A* Gens

Im *SCN5A* Gen, welches den spannungsabhängigen Natriumkanal  $\text{Na}_v1.5$  am Herzen codiert, konnten innerhalb des Patientenkollektivs zwei bekannte Mutationen (R1193Q und E1053K) und eine neue Mutation (A1186T) detektiert werden. Abb. 3.2 zeigt eine Übersicht über deren Lokalisation. Es befinden sich alle drei Mutationen im DII-DIII Linker des Proteins.

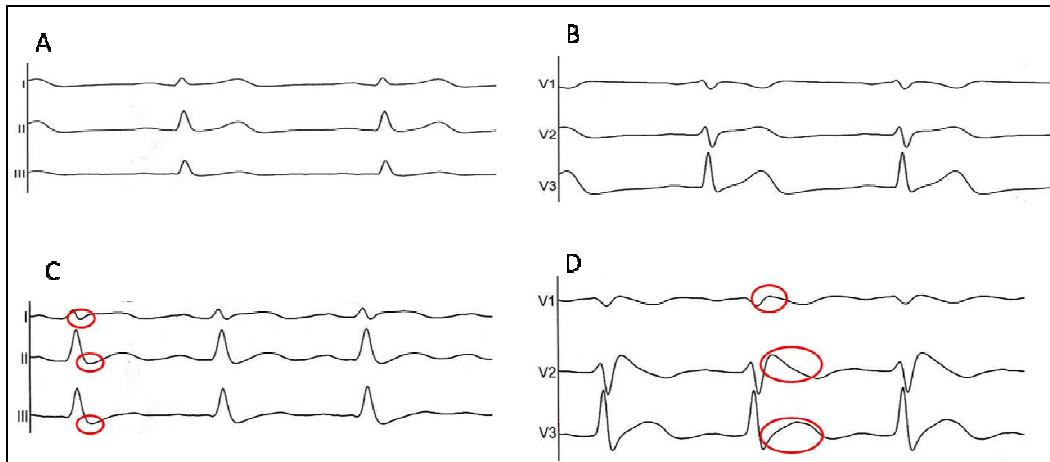


**Abb. 3.2.: Schematische Darstellung des  $\text{Na}_v1.5$  Kanals.** Übersicht über die Lokalisation der gefundenen Mutationen. Alle drei Mutationen befinden sich im DII-DIII Linker des Proteins.

#### 3.2.1.1 Mutation R1193Q

Vorgeschichte:

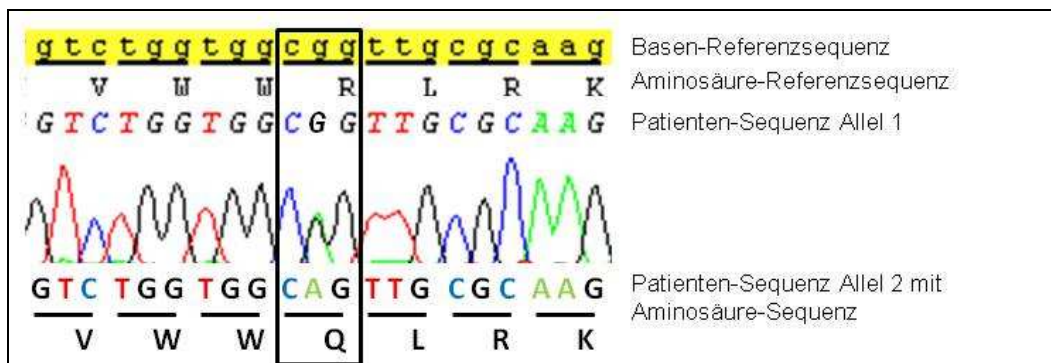
Ein 47-jähriger Vietnamese klagte, dass er nachts mehrfach wegen Palpitationen aufgewacht sei. Es wurde zunächst ein EKG beim Hausarzt angefertigt, welches typische Veränderungen mit Hinweis auf das Brugada Syndrom zeigte. Nach Überweisung in die Kerckhoff Klinik wurde ein Aufnahme EKG angefertigt, das diese Veränderungen jedoch nicht bestätigte. Mit Hilfe des Klasse I Antiarrhythmikum Ajmalin können nicht eindeutige bzw. grenzwertige Brugada Syndrom-Veränderungen demaskiert und im EKG dargestellt werden. Im Fall des Patienten ergab die Gabe von Ajmalin einen positiven Brugada Syndrom Befund (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3.: 12-Kanal-EKG des Patienten vor und nach Ajmalinbehandlung.** A) Extremitätenableitung nach Einthoven (I – III) und B) Brustwandableitungen (V1 – V3) des 12-Kanal-EKGs ohne Ajmalingabe. In einem Zeitraum von 10 Minuten wurde dem Patienten alle 2 Minuten 10 mg Ajmalin i.v. injiziert. Die Enddosis lag bei 1 mg/kg Körpergewicht. C) Extremitätenableitung nach Einthoven (I – III) und D) Brustwandableitungen (V1 – V3) des 12-Kanal-EKGs nach Ajmalininjektion. Durch das Ajmalin konnte in C) eine S-Zacke und in D) eine ST-Streckenerhebung demaskiert werden, welche beide Kriterien für das Brugada Syndrom sind.

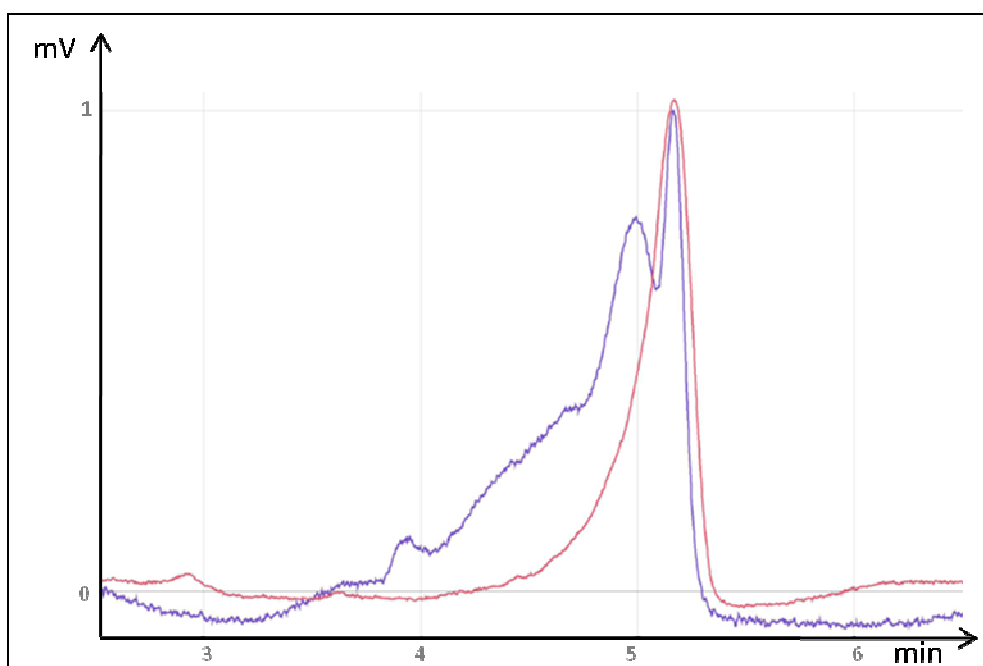
Nach Injektion der Volldosis von 1mg/kgKG konnte man in der Extremitätenableitung I – III eine S-Zacke erkennen, welche dem Brugada Syndrom (BrS) zugeordnet werden kann. In Ableitung V1 – V3 kam es durch Ajmalin zur ST-Streckenerhebung, welche ebenfalls ein Kriterium für BrS darstellt. Trotz der Volldosisgabe kam der Patient nicht ins Kammerflimmern.

Um die Diagnose „Brugada Syndrom“ zu bestätigen, wurde ein genetisches Screening durchgeführt. Hierzu wurde das *SCN5A* Gen mittels Direktsequenzierung untersucht, bei dem in Exon 20 eine Mutation detektiert werden konnte. In diesem Fall wird die Base Guanin durch Adenin ersetzt. Da es sich bei der untersuchten DNA um genomische DNA handelt, lassen sich beide Peaks im Elektropherogramm darstellen (Abb. 3.4). Dieser Basenaustausch hat zur Folge, dass sich die Aminosäure im Protein ändert. In Position 1193 der Aminosäurekette kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Arginin (R) durch Glutamin (Q). Diese Mutation R1193Q befindet sich im Bereich des DII-DIII Linkers des Natriumkanals.



**Abb. 3.4.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exon 20 des Brugada Syndrom Patienten.** Die Referenzsequenz des *SCN5A* Gens ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz des Patienten.

Da es sich um eine vererbte Mutation handelt und der Patient fünf Kinder hat, wurde auf Wunsch der Familie ein Screening der Kinder zur Risikoeinschätzung durchgeführt. Mittels dHPLC wurde nur das Exon 20 im Schnellverfahren gescreent. Im Anschluss wurden nur die Proben der Kinder mit auffälligen Chromatogrammen sequenziert.



**Abb. 3.5.: Elutionsdiagramm des Exon 20 des *SCN5A* Gens.** Rot: unauffällige Probe. Lila: mutierte Probe. Da Heteroduplices schneller von der Säule gewaschen werden als Homoduplices, erscheint im Elutionsdiagramm bei mutierten Exons ein Doppelpeak, ein Hinweis auf eine heterozygot aufgetretene Mutation.

Drei der fünf Kinder zeigten einen auffälligen Befund, worauf diese Proben sequenziert wurden. Hierbei konnte in allen drei Proben die Mutation R1193Q nachgewiesen werden.

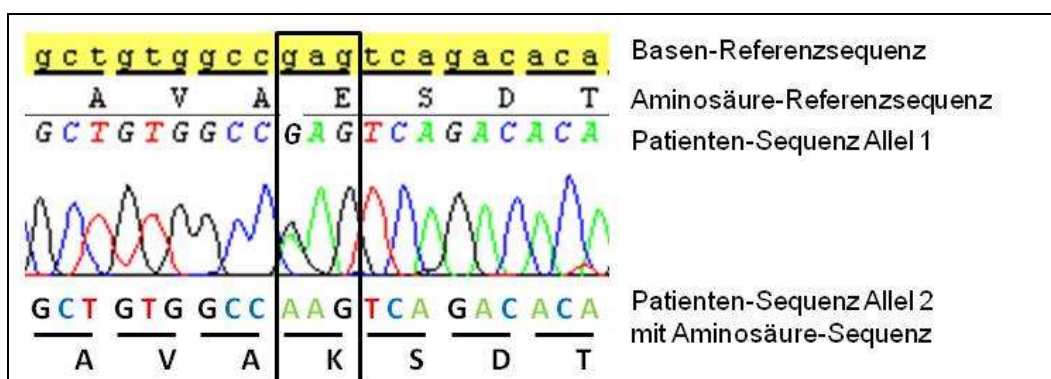
a a g g t c t g g t g g c g g t t g c g c a a g a c c t g c t a c c a c	Referenzsequenz
K V W W R L R K T C Y H	Aminosäure-Sequenz
A A G G T C T G G T G G C R G T T G C G C A A G A C C T G C T A C C A C	Kind 1
A A G G T C T G G T G G C R G T T G C G C A A G A C C T G C T A C C A C	Kind 2
A A G G T C T G G T G G C R G T T G C G C A A G A C C T G C T A C C A C	Kind 3

**Abb. 3.6.: Überblick über die Sequenzen der Kinder.** Ausschnitt aus Exon 20, des *SCN5A* Gens. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befindet sich die Aminosäure-Sequenz. „R“ steht für Base A bzw. G. An dieser Stelle befindet sich die heterozygote Mutation R1193Q.

### 3.2.1.2 Mutation E1053K

Vorgeschichte:

Ein 38-jähriger Mann wurde wegen Herzrhythmusstörungen und nach einer Synkope mit Verletzungsfolge kardiologisch untersucht. Es konnte keine koronare Herzerkrankung festgestellt werden. Das MRT zeigte eine mögliche dilatative Kardiomyopathie. Dennoch erbrachte die klinische Untersuchung im vorliegenden Fall keine eindeutige Diagnose, worauf dem Patienten Blut zum genetischen Screening entnommen, und die Long QT Syndrom relevanten Gene untersucht wurden.



**Abb. 3.7.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Patienten mit unklarer Diagnose.** Die Referenzsequenz des *SCN5A* Gens ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz des Patienten.

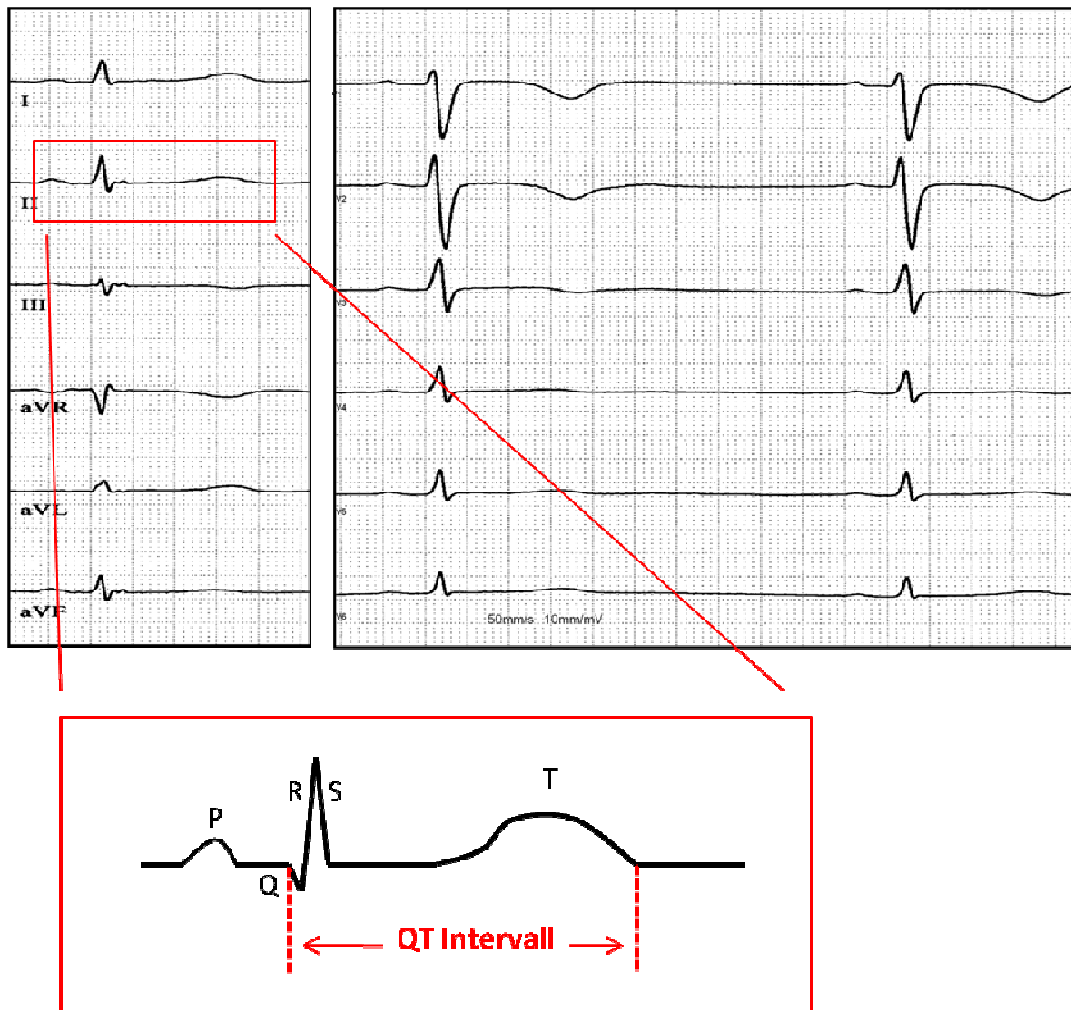
Es konnte in Exon 17 des *SCN5A* Gens eine Veränderung festgestellt werden. Es handelt sich um einen heterozygoten Basenaustausch, bei dem Guanin durch Adenin ersetzt wird (Abb. 3.7). Dies hat zur Folge, dass im Protein die Aminosäure Glutaminsäure (E) in Position 1053 durch Lysin (K) ausgetauscht wird.

Da diese bekannte Mutation bereits in der Literatur (Priori et al, 2000; Mohler et al, 2004) beschrieben wurde, wurden keine weiteren Untersuchungen zu deren Charakterisierung durchgeführt.

### **3.2.1.3 Mutation A1186T**

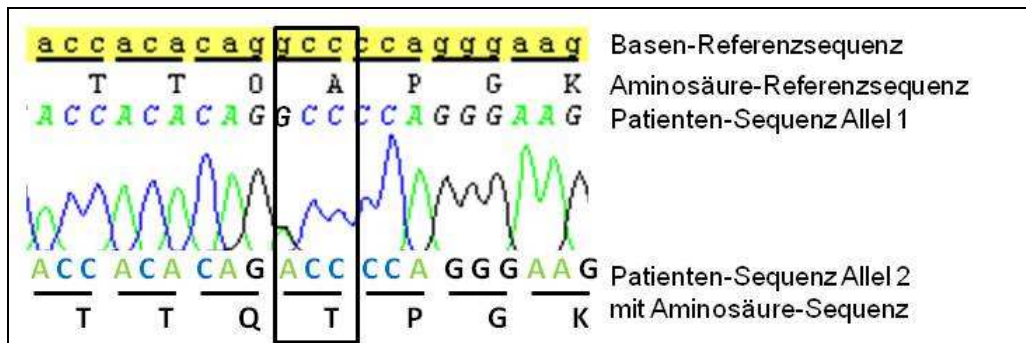
Vorgeschichte:

Eine 33-jährige Frau erlitt im Rahmen einer Gastroskopie einen Herzstillstand und musste reanimiert werden. In der Kerckhoff-Klinik wurden daraufhin verschiedene Untersuchungen wie MRT, Echokardiogramm, 12-Kanal-EKG sowie Langzeit EKG durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass die QT-Zeit im EKG verlängert war (Abb. 3.8). Strukturelle Herzerkrankungen konnten ausgeschlossen werden. Wegen des Reanimationsereignisses wurde der Patientin ein Defibrillator implantiert. Aufgrund eines Kinderwunsches der Patientin wurde zur Risikoeinschätzung ein genetisches Screening der LQTS relevanten Gene durchgeführt.



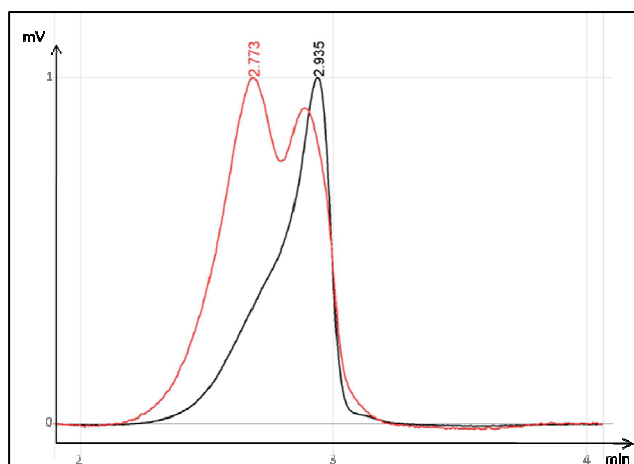
**Abb. 3.8.: 12-Kanal-EKG der LQTS-Patientin.** Es sind die Extremitätenableitungen nach Einthoven (I – III) und nach Goldberger (aVR, aVL, aVF) (linke Seite) sowie die Brustwandableitungen V1 – V6 (rechte Seite) dargestellt. Die QT-Zeit ist mit 440msec erhöht.

Im *SCN5A* Gen, welches den spannungsabhängigen Natriumkanal  $\text{Na}_v1.5$  im Herzen codiert, konnte eine neue Mutation nachgewiesen werden. Hierbei wird die erste Base des Triplets GCC durch Adenin zu ACC ersetzt. Im Protein kommt es in Position 1186 zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin (A1186T) (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der LQTS-Patientin.** Die *SCN5A* Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Da es sich um eine neue Sequenzvariante handelt, wurden Untersuchungen zu ihrer Häufigkeit durchgeführt. Hierbei konnte mittels dHPLC bei 200 gesunden Kontrollpersonen diese Sequenzvariante nicht detektiert und kann somit als Mutation angesehen werden (Abb. 3.10).

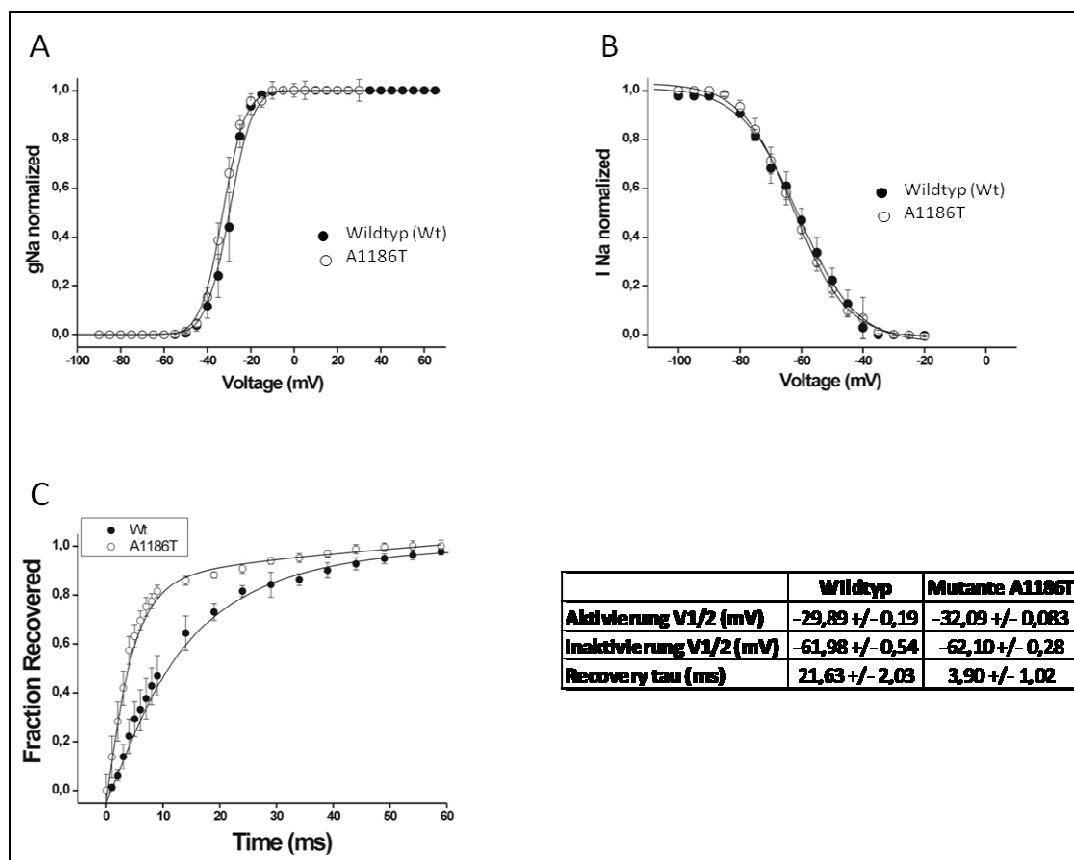


**Abb. 3.10.: Elutionsdiagramm des Exon 20 des *SCN5A* Gens.** Rot: Probe der Patientin mit der Mutation A1186T. Schwarz: Kontroll-Probe.

Um diese Mutation weiter zu charakterisieren, wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor Tytgat (Leuven, Belgien) im Oozytenexpressionssystem die Auswirkung dieser Veränderung auf den Natriumkanal im Vergleich zum Wildtyp-Kanal getestet. In diesen Untersuchungen zeigte es sich, dass sowohl Aktivierung als auch Inaktivierung des Kanals nicht von der Mutation beeinflusst werden. Jedoch ist die Recovery, die Erholungsphase des Kanals, um das 5-fache verkürzt (Abb. 3.11). Die Recovery-Zeit des Wildtyp-Kanals betrug 21,63 msec, während die Recovery-Zeit der A1186T Mutante nur 3,90 msec betrug. Die Mutante A1186T



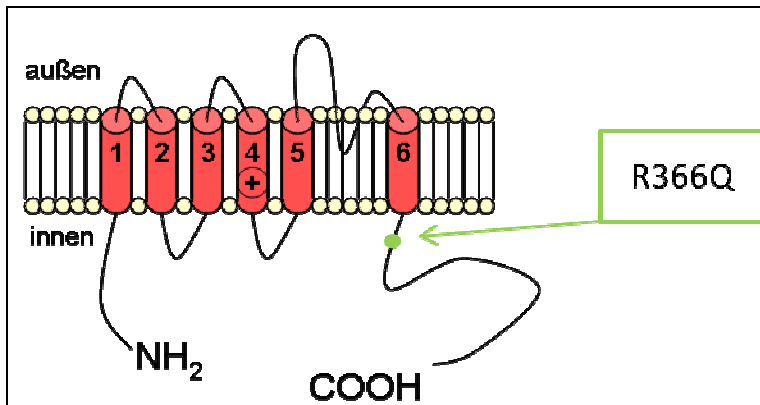
hat zur Folge, dass der Ionenkanal 5-mal schneller wieder erregbar ist, und somit während der Depolarisationsphase des Aktionspotenzials mehr Natriumionen fließen können.



**Abb. 3.11.: Spannungskurven des Nav1.5 Wildtyps und der Nav1.5 Mutante A1186T.** Sowohl Aktivierung (A) als auch Inaktivierung (B) werden nicht von der Mutation beeinflusst. C) Die Recovery der A1186T Mutante ist deutlich verkürzt.

### 3.2.2 Untersuchung des *KCNQ1* Gens

Das *KCNQ1* Gen codiert den spannungsabhängigen Kaliumkanal K<sub>v</sub>7.1, welcher überwiegend im Herzen exprimiert wird. Bei der Untersuchung der LQTS Patienten konnte in einem Fall eine bereits bekannte Mutation nachgewiesen werden.



**Abb. 3.12.:** Lokalisation der Mutation im K<sub>v</sub>7.1 Kanal. Die Mutation R366Q befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins.

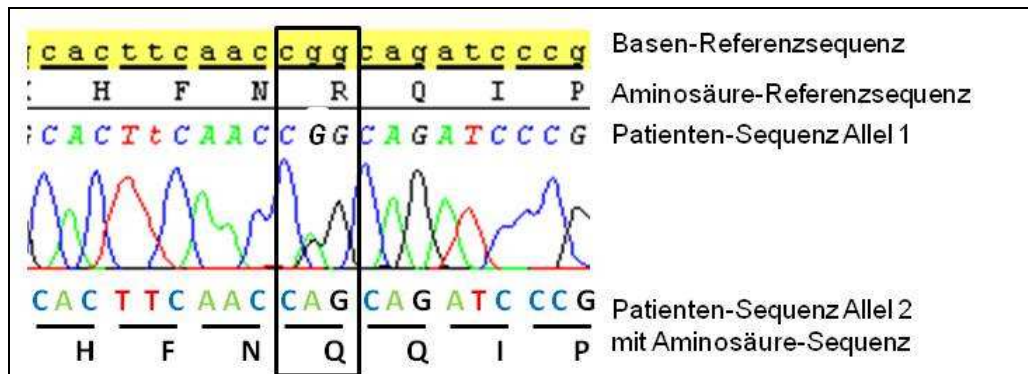
#### 3.2.2.1 Mutation R366Q

Vorgeschichte:

Eine 43-jährige Frau erlitt aus völliger Gesundheit Kammerflimmern und musste reanimiert werden. Während der kardiologischen Untersuchung konnten keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden. Im EKG konnte eine verlängerte QT-Zeit festgestellt werden.

Aufgrund der LQTS Diagnose wurden die LQTS relevanten Gene auf Sequenzveränderungen hin untersucht. Im *KCNQ1* Gen konnte ein Basenaustausch in Exon 8 nachgewiesen werden, der zum Austausch der Aminosäure Arginin (R) in Position 366 führt (Abb. 3.13). Diese Mutation (R366Q) ist bereits in der Literatur beschrieben (Splawski et al, 2000), so dass weitere Untersuchungen nicht durchgeführt wurden. Bei 200 Kontrollpersonen war diese

Mutation nicht nachgewiesen worden, worauf eine Korrelation dieser Mutation mit dem Krankheitsbild Long QT Syndrom angenommen wurde.

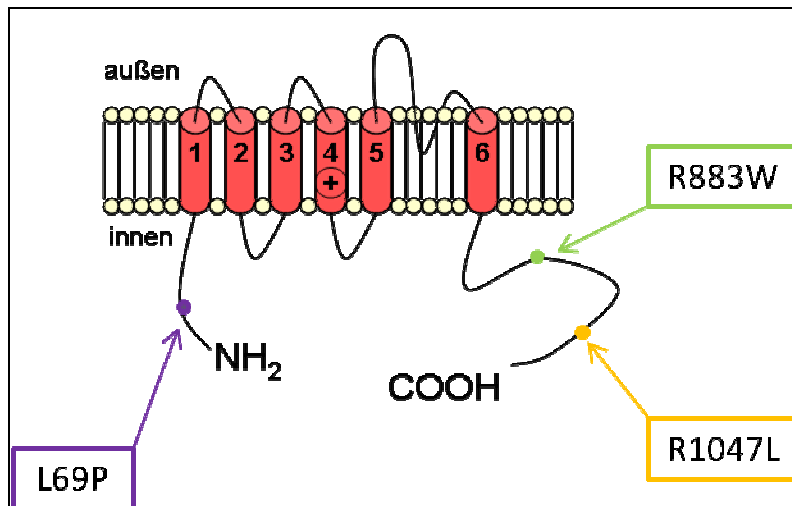


**Abb. 3.13.:** Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exon 8 des *KCNQ1* Gens. Gelb unterlegt ist die Referenzsequenz, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

### 3.2.3 Untersuchung des *KCNH2* Gens

Der spannungsabhängige Kaliumkanal hERG, welcher hauptsächlich im Herzen exprimiert wird, wird von dem Gen *KCNH2* codiert. In 25 – 30 % der LQTS-Fälle kann man Mutationen in diesem Gen nachweisen.

Während den molekulargenetischen Untersuchungen konnten bei drei Patienten Mutationen im *KCNH2* Gen detektiert werden (Abb. 3.14). Eine bekannte Mutation (R1047L) befindet sich im C-Terminus des Kanals wie auch eine neue Mutation (R883W). Eine weitere neue Mutation (L69P) konnte im N-Terminus des Proteins, in der PAS Domäne, gefunden werden.



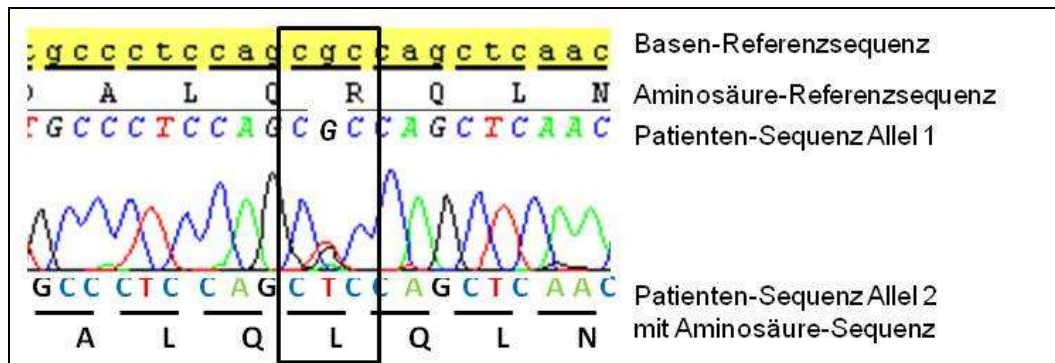
**Abb. 3.14.: Schematische Darstellung der Lokalisation aller drei *KCNH2* Mutationen im hERG Kanal.** Eine Mutation wurde im N-Terminus gefunden, zwei Mutationen konnten im C-Terminus nachgewiesen werden.

### 3.2.3.1 Mutation R1047L

Vorgeschichte:

Eine 48-jährige Frau wurde durch Präsynkopen und einer Synkope in die Kerckhoff-Klinik überwiesen. Morphologisch konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Die Verdachtsdiagnose Brugada-Syndrom wurde durch einen Ajmalintest bestätigt, bei dem in Ableitung V1 und V2 eine ST-Streckenerhebung im EKG dargestellt werden konnte. Parallel wurde ein genetisches Screening durchgeführt. Hierbei wurde das für BrS relevante Gen *SCN5A* untersucht. Da in diesem Gen keine Veränderung gefunden werden konnte, wurden nachträglich die LQTS relevanten Gene untersucht.

Bei der Untersuchung des *KCNH2* Gens konnte eine Sequenzvariante in Exon 13 nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Dieser Basenaustausch hat einen Aminosäureaustausch zur Folge: Arginin wird durch Leucin ersetzt (R1047L). Es handelt sich in diesem Fall um eine bereits bekannte Mutation (Anson et al, 2004, Mank-Seymour et al, 2006).



**Abb. 3.15.: Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 13 des *KCNH2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Laut diesen Veröffentlichungen hat diese Mutation keinen signifikanten Einfluss auf die Funktionalität des Natriumkanals. In elektrophysiologischen Studien konnte kein Unterschied zwischen der R1047L Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Es wurden daher keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

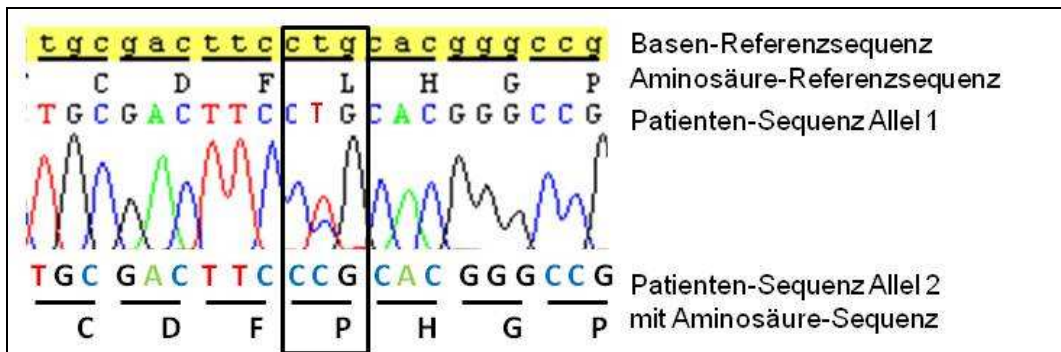
### 3.2.3.2 Mutation L69P

Vorgeschichte:

Eine 35-jährige Frau, die seit 10 Jahren Ausdauersport (Marathon) betreibt, klagt nachts über unruhigen Schlaf mit schnellem Herzschlag. In Ruhephasen nach körperlicher Anstrengung klagt sie über Schwindel und ebenfalls schnellem Herzschlag. Morphologisch konnten keine Veränderungen am Herzen festgestellt werden. Das EKG zeigte supraventrikuläre Extrasystolen und arterielle Tachykardien. Es wurde zunächst ein Brugada Syndrom diagnostiziert. Einige Jahre später konnte eine Verlängerung der QT-Zeit diagnostiziert werden.

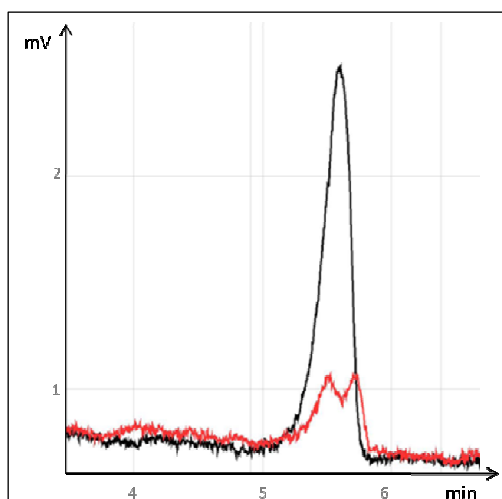
Da die klinische Diagnose auf ein Brugada Syndrom hinwies, wurde zunächst nur das BrS relevante Gen *SCN5A* untersucht, was keine Abweichungen in der Basensequenz erkennen ließ. Daraufhin wurden weitere Ionenkanal-Gene (*KCNH2*, *KCNQ1*, *KCNE1*, *KCNE2* und *KCNJ2*) untersucht. Dabei konnte in

Exon 2 des *KCNH2* Gens eine Sequenzänderung festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch im Protein führt. Leucin in Position 69 wird durch Prolin ersetzt.



**Abb. 3.16.: Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 2 des *KCNH2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Diese Sequenzvariante ist neu. Mittels dHPLC wurden Untersuchungen zur Häufigkeit durchgeführt. In 200 Blutproben von gesunden Kontrollpersonen konnte diese Variante nicht nachgewiesen und kann somit als Mutation angesehen werden (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17.: Elutionsdiagramm des Exon 2 des *KCNH2* Gens.** Rot: Probe der Patientin mit der Mutation L69P. Schwarz: Kontroll-Probe.

Um diese neue Mutation zu charakterisieren wurden im Labor Tytgat (Leuven, Belgien) Oozytenexpressions-Veruche durchgeführt. Hierbei sollte der mutierte Kaliumkanal im Vergleich zum Wildtyp Kanal untersucht werden. Trotz Einsatz

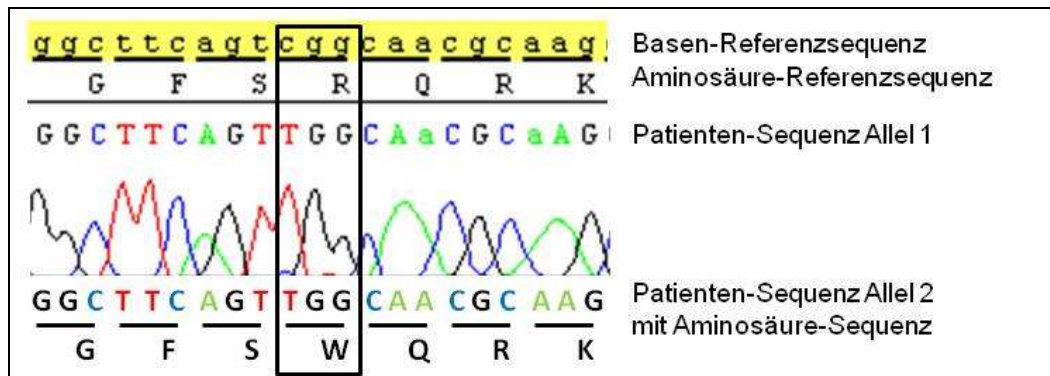
verschiedener RNA-Konzentrationen (1 bis 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) ließen sich keine Ionenströme an den Oozyten messen. Auch eine verlängerte Inkubationsdauer der RNA in den Oozyten (1 – 4 Tage) erbrachte keine Ergebnisse.

Um zu prüfen, ob der mutierte Kaliumkanal in den Oozyten überhaupt exprimiert wird, wurden Westernblot-Versuche mit hERG-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Blotting Bild kann leider nicht dargestellt werden.

### **3.2.3.3 Mutation R883W**

Eine 47-jährige Frau geriet ins Kammerflimmern und musste reanimiert werden. Bei der kardiologischen Untersuchung wurden keine morphologischen Veränderungen festgestellt, und auch das EKG zeigte außer Tachykardien keine Auffälligkeiten. Ein Ajmalintest verlief negativ. Da es sich hierbei um eine unklare Diagnose handelt, wurde der Patientin ein genetisches Screening angeboten, bei welchem die LQTS relevanten Gene sowie das CPVT relevante Gen *RyR2* untersucht wurden.

Im *KCNH2* Gen konnte eine neue Sequenzvariante in Exon 11 nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um einen homozygoten Basenaustausch im C-Terminus des hERG Kanals. Das Basentriplett CGG wird durch TGG ersetzt (Abb. 3.18). Im Protein hat dies zur Folge, dass in Position 883 Arginin durch Tryptophan (R883W) ersetzt wird. Um zu klären, ob es sich um eine Mutation oder einen Polymorphismus handelt, wurden mittels Direktsequenzierung Untersuchungen zur Häufigkeit durchgeführt. In 200 Kontrollproben gesunder Probanden konnte diese Sequenzvariante nicht nachgewiesen werden, und kann somit als Mutation angesehen werden.



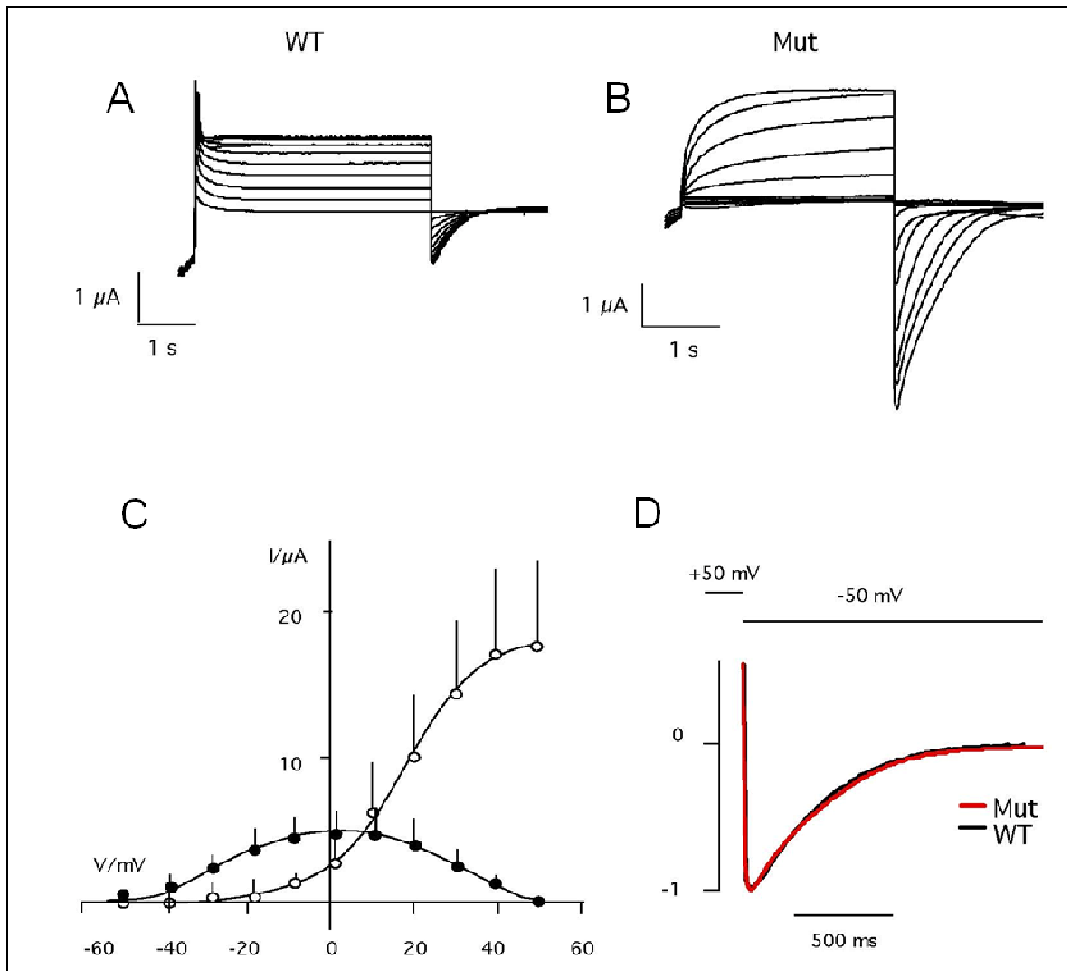
**Abb. 3.18.: Ausschnitt des Elektropherogramms von Exon 11 des *KCNH2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Um die Auswirkung der Mutation auf die Kanalfunktion weiter zu charakterisieren, wurden der WT Kanal und die Mutante in *Xenopus* Oozyten exprimiert und mittels Strom/Spannungsmessungen untersucht. In diesen Untersuchungen zeigte sich das für den hERG-Kanal typische Schaltverhalten. Mit zunehmend positiven Spannungen steigt zuerst die Aktivität des Kanals an, bevor sie dann bei noch positiveren Spannungen wieder abnimmt (Abb. 3.19 C). Die komplexe Strom/Spannungsempfindlichkeit des hERG Kanals resultiert in der glockenförmigen stationären Strom/Spannungskennlinie, die in Abb. 3.19 C zu sehen ist. Die Mutation R883W zeigt ein auffällig anderes Schaltverhalten. Mit zunehmenden positiven Testspannungen steigt der Strom immer stärker an, bevor er eine Sättigung erreicht. Der Mutation R883W fehlt die auffällige träge Abnahme des Kanalstroms bei positiven Spannungen. Beim Vergleich der I/V Kurven von WT und Mutante fällt auf, dass die Aktivierung der Mutante weit in den positiven Spannungsbereich verschoben ist; während der WT Kanal schon bei -40 mV Aktivität zeigt, beginnt die Mutante erst bei ca. -20 mV zu aktivieren.

Typisch für hERG Kanäle ist, dass es bei einem Spannungssprung von einer positiven Spannung auf eine negative Spannung zu großen transienten Strömen kommt. Dieser Strom resultiert daraus, dass diese Kanäle aus dem inaktiven Zustand zuerst den offenen Zustand passieren müssen, bevor sie den geschlossenen Zustand erreichen (Abb. 3.19). Diese sogenannten transienten Ströme sind sowohl beim WT-Kanal wie auch bei der Mutation R883W zu beobachten. Die Mutation hat offensichtlich nur einen Einfluss auf die relativen Geschwindigkeiten mit der der Kanal spannungsabhängig aktiviert/inaktiviert. Ein



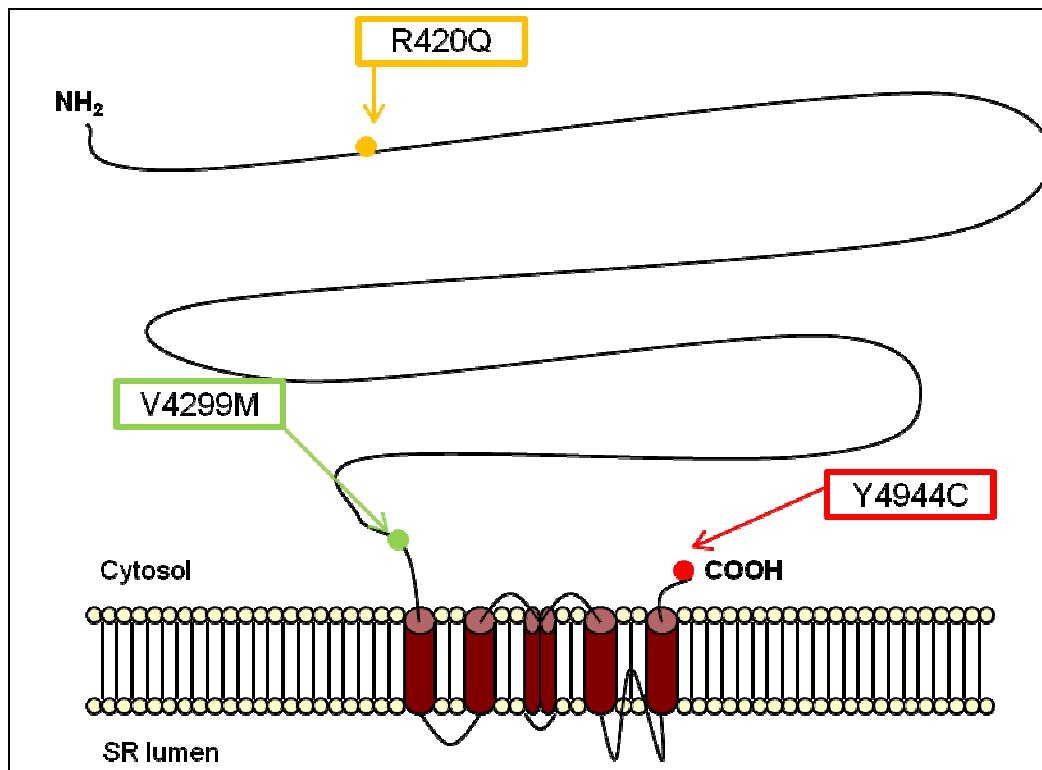
Vergleich der transienten Ströme von WT-Kanal und Mutante zeigt, dass beide die selbe Geschwindigkeit aufweisen woraus man schließen kann, dass die Mutation vor allem die Reaktionen beeinflusst, die für die spannungsabhängige Aktivieren/Inaktivierung verantwortlich sind. Die Rückreaktion in den geschlossenen Zustand ist weniger betroffen.



**Abb. 3.19.: Gemessene Kaliumströme** von A) hERG Wildtyp und B) hERG-Mutation R883W. Die Stromantworten wurden mit einem Spannungsprotokoll hervorgerufen, bei dem die Zellen von einer Haltespannung von -80 mV zu Testspannungen zwischen +60 mV und -100 mV geclamt wurden. In einem dritten Schritt wurden die Zellen zu einem Testpotential von -50 mV geclamt, um die für hERG typischen transienten Ströme zu registrieren. C) zeigt den Vergleich in der stationären Strom-Spannungskurve für den WT Kanal (gefüllte Symbole) und die Mutation R883W (offenen Symbole). Die mutierten Kanäle aktivieren erst bei positiveren Spannungen und sie zeigen keine Inaktivierung bei extrem positiven Spannungen. D) Verlauf des transienten Stroms nach Spannungssprung von +50 mV auf -50 mV für WT-Kanal und Mutante aus Messung in A und B. Nach Normierung der transienten Ströme zeigen beide Ströme den gleichen Verlauf.

### 3.2.4 Untersuchung des *RyR2* Gens

Der kardiale Ryanodin Rezeptor wird von dem Gen *RyR2* codiert. Dieses Gen ist eines der größten Gene des menschlichen Genoms. Es umfasst 105 Exons und hat eine Größe von über 800 kb. Aufgrund seiner Größe wird bei der Analyse des *RyR2* Gens eine Hot-Spot Untersuchung durchgeführt, bei welcher die am häufigsten mutierten Bereiche untersucht werden.



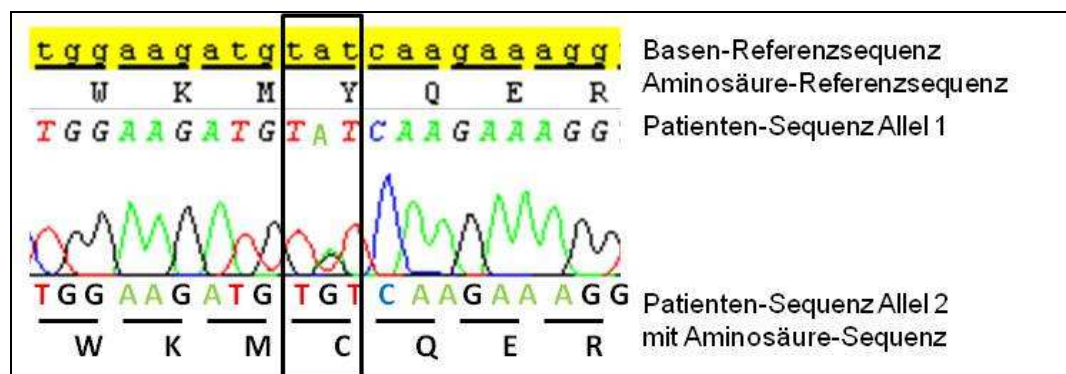
**Abb. 3.20.: Schematische Darstellung des Ryanodin Rezeptors mit der Lokalisation der nachgewiesenen Mutationen.** Es konnten bei drei Patienten Mutationen im *RyR2* Gen gefunden werden: Die Mutation R420Q liegt im Bereich des N-Terminus, Y4944C liegt C-Terminus und die Mutation V4299M befindet sich zwischen der zentralen Domäne und der Transmembrandomäne.

Bei der Untersuchung des Ryanodin Rezeptors konnten bei drei Patienten jeweils eine neue Mutation nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Eine dieser Mutationen befindet sich im N-Terminus (R420Q), eine weitere im C-Terminus (Y4944C) und die dritte Mutation (V4299M) zwischen der zentralen Domäne und der Transmembrandomäne.

Da es sich um einen sehr komplexen Kanal handelt, und die Möglichkeiten der Zellkultur von Herzzellen nicht gegeben waren, konnten keine weiteren Untersuchungen zur Charakterisierung der gefundenen Mutationen im Ryanodin Rezeptor und dessen Funktionalität durchgeführt werden.

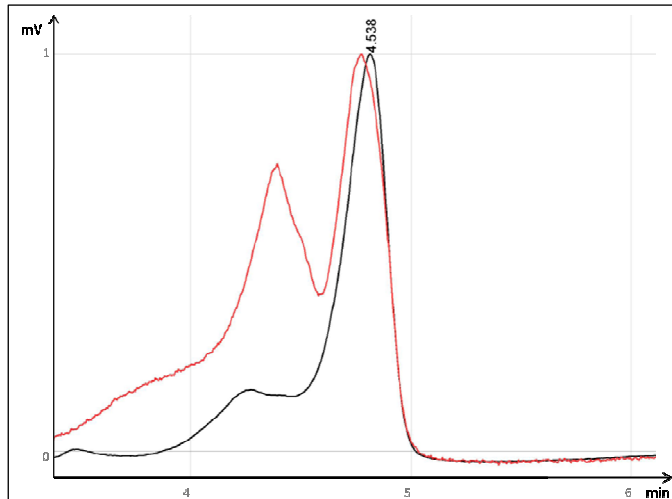
### 3.2.4.1 Mutation Y4944C

Bei diesem Fall handelt es sich um die gleiche Patientin, bei der bereits die Mutation R883W im *KCNH2* Gen gefunden wurde. Aufgrund der unklaren Diagnose wurde neben den LQTS relevanten Genen auch das für CPVT relevante Gen des Ryanodin Rezeptors untersucht. Im *RyR2* Gen konnte ebenfalls eine neue Sequenzvariante nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um eine heterozygote Veränderung der zweiten Base des Tripletts (Abb. 3.21). Im Protein kommt es im C-Terminus zu einem Austausch von Tyrosin durch Cystein in Position 4944.



**Abb. 3.21.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exon 105 des *RyR2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Auch in diesem Fall handelt es sich um eine neue Sequenzvariante, die bisher nicht in der Literatur beschrieben ist. Es wurden daher Untersuchungen zu ihrer Häufigkeit durchgeführt. Mittels dHPLC konnte diese Veränderung nicht in den 200 Proben gesunder Kontrollpersonen gefunden werden. Somit kann diese Sequenzvariante als Mutation angesehen werden (Abb. 3.22).



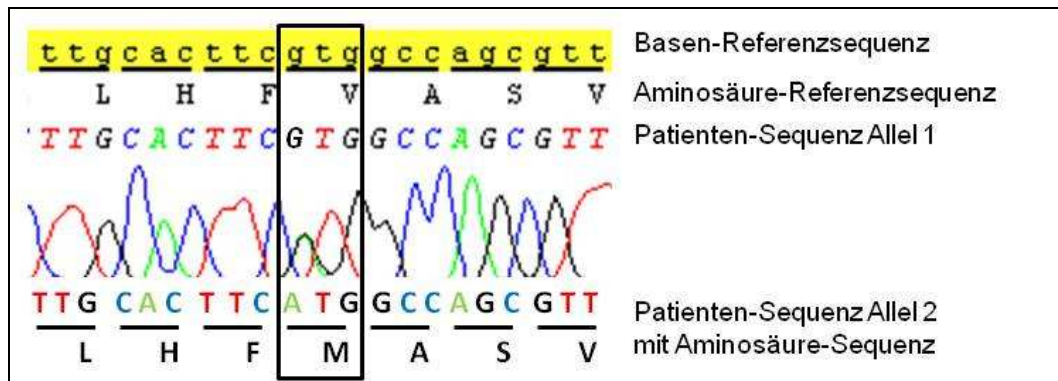
**Abb. 3.22.: Elutionsdiagramm des Exon 105 des *RyR2* Gens.** Rot: Probe der Patientin mit der Mutation Y4944C. Schwarz: Kontroll-Probe.

### 3.2.4.2 Mutation V4299M

Vorgeschichte:

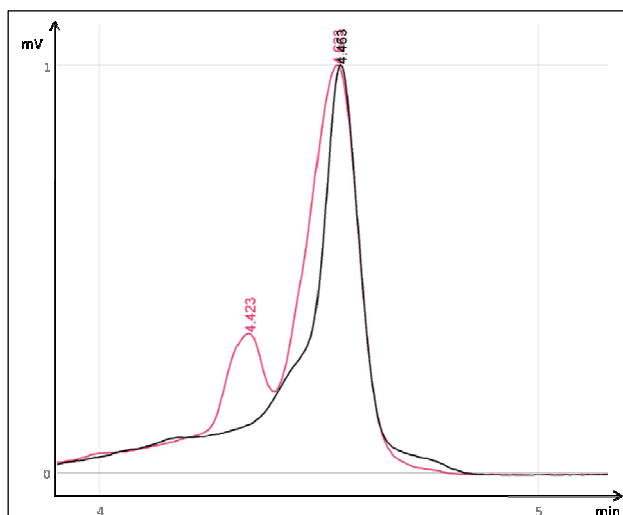
Eine 19-jährige Frau erlitt mehrfach Synkopen während der Schulpausen und während des Schwimmens. Grunderkrankungen sind nicht vorhanden gewesen. Morphologisch konnten keine Veränderungen am Herzen festgestellt werden, jedoch konnte im EKG eine verlängerte QT-Zeit nachgewiesen werden.

Da in der Kerckhoff Klinik LQTS diagnostiziert wurde, wurden zunächst die für dieses Syndrom relevanten Gene untersucht, was einen negativen Befund ergab und darauf weitere Gene untersucht wurden. Hierbei konnte im *RyR2* Gen eine Sequenzvariante in Exon 90 nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Es handelt sich um eine heterozygote Veränderung der ersten Base des Triplets GTG. Guanin wird durch Adenin ersetzt und führt auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch in Position 4299 von Valin durch Methionin.



**Abb. 3.23.: Ausschnitt dem Elektropherogramm des Exon 90 des *RyR2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Diese Veränderung ist neu, worauf Untersuchungen mittels dHPLC zur Häufigkeit dieser Variante durchgeführt wurden. In Proben von 200 Gesunden konnten keine Veränderungen im Exon 90 in Hinblick auf diese Sequenzvariante nachgewiesen werden, was die Mutation bestätigt.



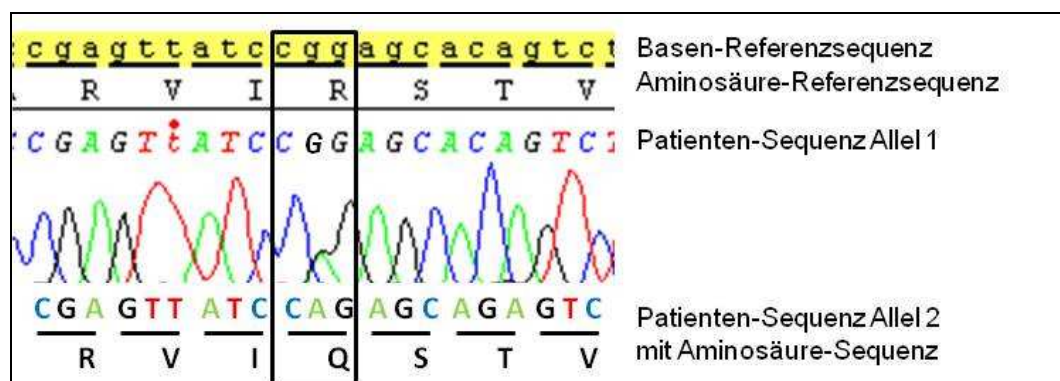
**Abb. 3.24.: Elutionsdiagramm des Exon 90 des *RyR2* Gens.** Rot: Probe des Patienten mit der Mutation V4299M. Schwarz: Kontroll-Probe.

### 3.2.4.3 Mutation R420Q

#### Vorgeschichte:

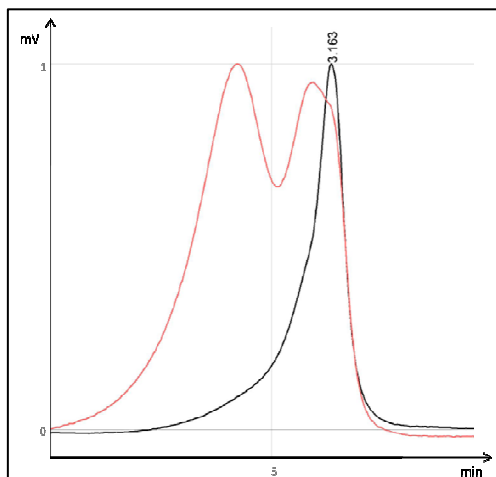
Eine 48-jährige Frau wurde in die Kerckhoff Klinik eingewiesen, weil bei ihr zuvor mehrere Synkopen aufgetreten waren. Nach eingehender klinischer Untersuchung wurde die Diagnose LQTS gestellt, und ein Defibrillator implantiert. Die Patientin wies eine auffällige Familienanamnese auf: Ihre Tochter war im Alter von 11 Jahren plötzlich verstorben. Ihr Bruder starb mit 10 Jahren sowie vier Cousins im Alter von 36-40 Jahren. Zwei Cousins waren obduziert worden, jedoch war makroskopisch die Todesursache nicht zu klären. Eine noch lebende Schwester der Patientin klagte ebenfalls über Synkopen.

Es wurden die LQTS relevanten Gene der Patientin untersucht, jedoch konnten keine genetischen Auffälligkeiten gefunden werden. Betrachtet man die Familienanamnese, so sind die plötzlichen Todesfälle bei Verwandten unter 40 Jahren typisch für CPVT, woraufhin das *RyR2* Gen untersucht wurde. Hierdurch konnte eine neue Sequenzvariante in Exon 14 gefunden werden (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25.: Ausschnitt dem Elektropherogramm des Exon 14 des *RyR2* Gens.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Patientin.

Mittels dHPLC wurden Häufigkeitsuntersuchungen durchgeführt. Bei Proben von 200 gesunden Kontrollpersonen konnte diese Veränderung nicht nachgewiesen und kann somit als Mutation angesehen werden.



**Abb. 3.26.: Elutionsdiagramm des Exon 14 des RyR2 Gens.** Rot: Probe des Patienten mit der Mutation R420Q. Schwarz: Kontroll-Probe.

In dem Triplet CGG ist die zweite Base Guanin heterozygot zu Adenin mutiert. Hierbei handelt es sich um einen Aminosäureaustausch in Position 420 des Proteins. Arginin wird durch Glutamin ersetzt. Die Mutation befindet sich im N-Terminus des Ryanodin-Rezeptors.

Da die Patientin noch lebende Geschwister, einen Sohn und Enkelkinder hat, wurde der Familie aufgrund der früh verstorbenen Familienangehörigen ein genetisches Screening empfohlen, um mögliche Merkmalsträger rechtzeitig zu identifizieren.

<b>cgagttatccggagcacagtcttc</b>	Referenzsequenz
<b>R V I R S T V F</b>	Aminosäure-Sequenz
CGAGTTATCC <b>R</b> GAGCACAGTCTTC	Patientin
CGAGTTATCCGGAGCACAGTCTTC	Sohn der Patientin
CGAGTTATCC <b>R</b> GAGCACAGTCTTC	Schwester 1 der Patientin
CGAGTTATCCGGAGCACAGTCTTC	Schwester 2 der Patientin
CGAGTTATCCGGAGCACAGTCTTC	Bruder der Patientin
CGAGTTATCCGGAGCACAGTCTTC	Schwester 3 der Patientin
CGAGTTATCC <b>R</b> GAGCACAGTCTTC	Sohn von Schwester 1

**Abb. 3.27.: Überblick über die Sequenzen der Familie.** Ausschnitt aus Exon 14. Die RyR2 Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befindet sich die Aminosäure-Sequenz. Es sind die Sequenzen der Proben der Patientin, von deren Sohn und Geschwister sowie des Sohns einer ebenfalls betroffenen Schwester dargestellt. „R“ steht für Base A bzw. G. An dieser Stelle befindet sich die heterozygote Mutation R420Q.

Zur Familienuntersuchung kamen der Sohn der Patientin, drei Schwestern und ihr Bruder. Da eine der drei Schwestern als Trägerin der Mutation identifiziert wurde, und sie ein Sohn hat, wurde dieser ebenfalls untersucht. Auch er ist Träger der Mutation R420Q. Von einer verstorbenen Cousine war noch getropftes Blut vorhanden, welches nach Absprache mit den Angehörigen untersucht wurde. Diese Cousine war nicht Merkmalsträgerin.

### **3.2.5 Untersuchung des *DSG2* Gens**

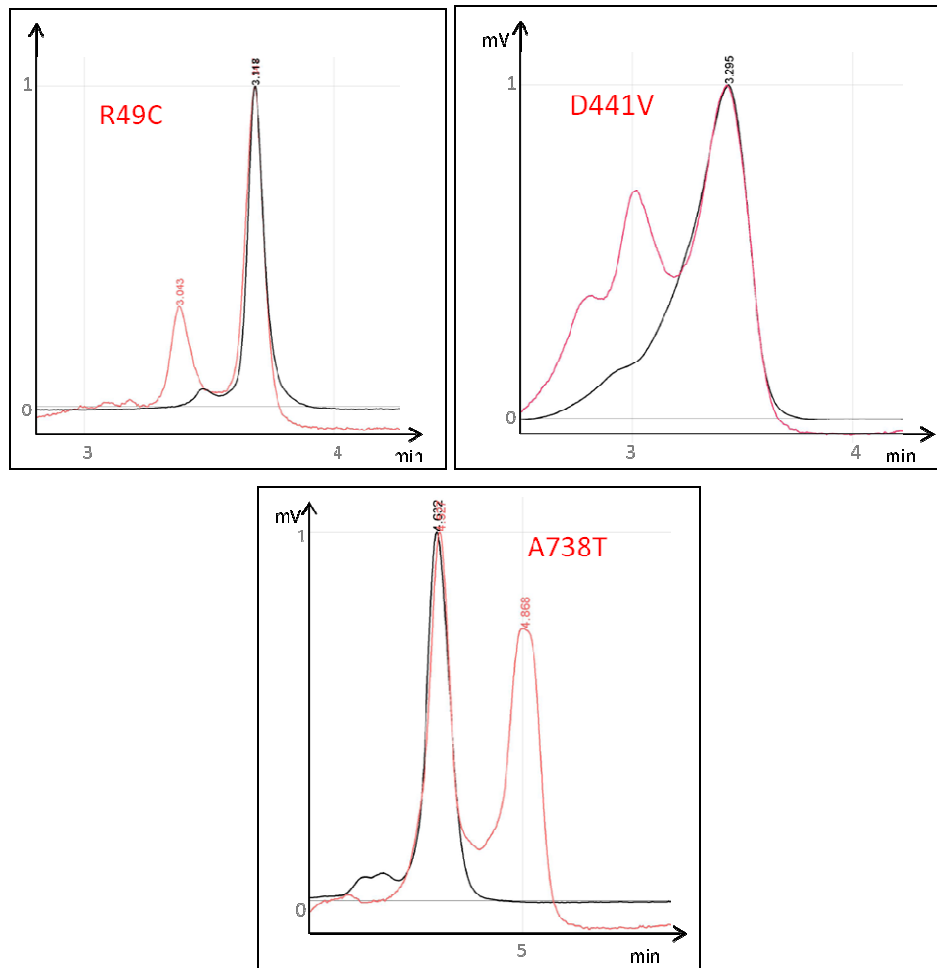
Ein wichtiges Protein innerhalb des kardialen Desmosoms ist das Desmoglein-2. Codiert wird es von dem Gen *DSG2*. Desmoglein-2 ist ein Bindeglied zwischen den intrazellulären Cadherinen und den desmosomalen Proteinen der Nachbarzelle und wird mit ARVC assoziiert.

Im Rahmen der Diplomarbeit von Samira Barazi im Institut für Rechtsmedizin Frankfurt wurde das *DSG2* Gen für die Routineuntersuchung etabliert und bei Patienten mit ARVC untersucht.

Es wurden insgesamt 16 Patienten mit diagnostizierter oder mit Verdacht auf ARVC untersucht. Bei fünf Patienten konnten Sequenzvarianten gefunden werden (Abb. 3.31).

Da es sich bei drei der fünf nachgewiesenen Sequenzvarianten um neue noch nicht beschriebene Veränderungen handelt, wurden Untersuchungen zur Häufigkeit durchgeführt. Mittels dHPLC wurden 200 Proben gesunder Kontrollpersonen auf diese Sequenzvarianten hin untersucht. Keine der Varianten konnte in den Kontrollen nachgewiesen werden. Somit kann man alle als Mutationen ansehen (Abb. 3.28 – 3.30).





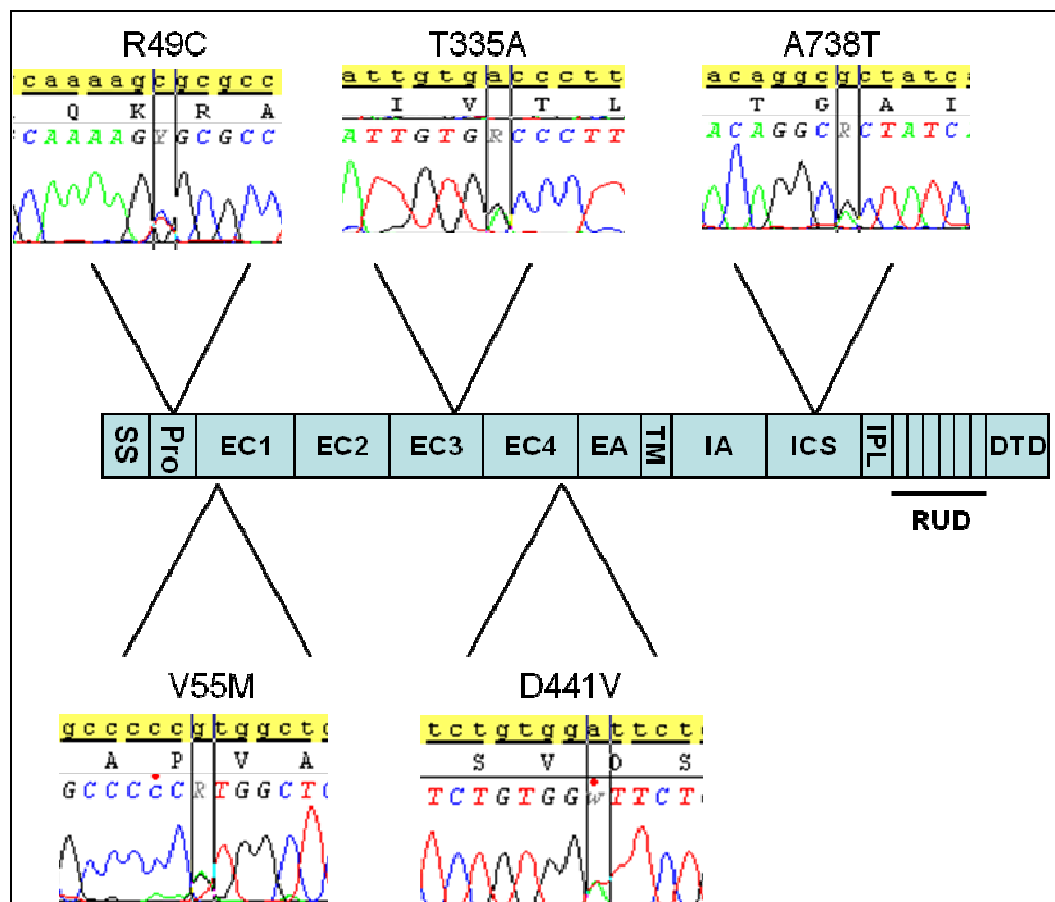
**Abb. 3.28 – 3.30.: Elutionsdiagramme der neuen Mutationen des *DSG2* Gens.** Rot: Probe des jeweiligen Patienten. Schwarz: Kontroll-Proben.

Die Mutation R49C befindet sich im Propeptide des *DSG2* innerhalb der Furinfurche (R-X-K-R), welche für die posttranslationale Modifikation eine wichtige Rolle spielt und für die Ausbildung eines funktionsfähigen Proteins verantwortlich ist. In Exon 3 des *DSG-2* Gens kommt es zu einem heterozygoten Austausch der Base Cytosin durch Thymin.

Die bereits bekannten Mutationen V55M und T335A konnten in den Domänen EC1 und EC3 identifiziert werden. Bei Mutation V55M kommt es zu einem heterozygoten Basenaustausch der Base Guanin durch Adenin in Exon 3. Bei Mutation T335A findet ebenfalls ein heterozygoter Austausch der Base Adenin durch Guanin in Exon 8 statt.

Eine neue Mutation (D441V) wurde in der EC4 Domäne gefunden. Hierbei wird in Exon 10 Adenin durch Thymin heterozygot ausgetauscht. Diese Bereiche (EC1-EC4) sind extrazelluläre Domänen, die die Interaktion der desmosomalen Cadherine gewährleisten.

Eine weitere neue Mutation A738T wurde in der intrazellulären Cadherin-spezifischen Domäne (ICS) nachgewiesen. In Exon 14 wird Guanin durch Adenin heterozygot ausgetauscht. In dieser Region binden die Armadillo Proteine, die die Bindung in das Zellinnere sicherstellen.



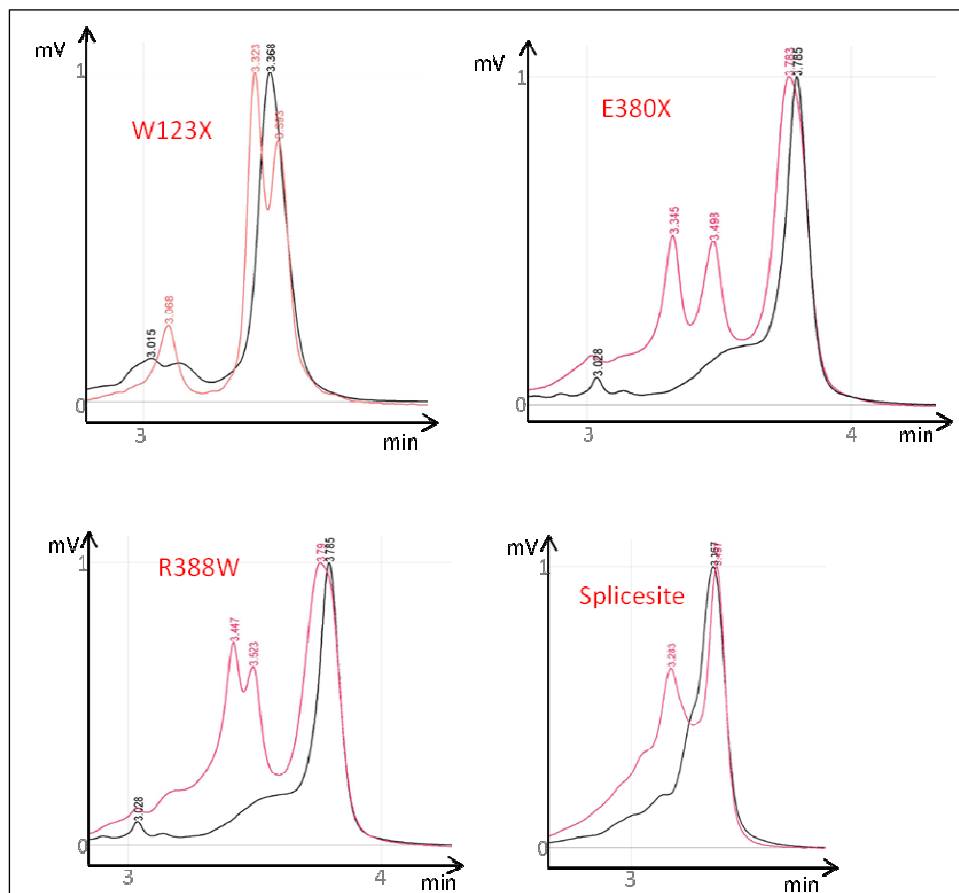
**Abb. 3.31.: Übersicht über die gefundenen Mutationen im Desmoglein-2 bei ARVC-Patienten.**

Die Mutation R49C befindet sich im Propeptid, drei weitere Mutationen (V55M, T335A und D441V) sind in den extrazellulären Domänen EC1- EC4 lokalisiert und eine Mutation konnte in der Cadherin-spezifischen Domäne (ICS-Domäne) nachgewiesen werden. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt. Darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz und die Basen-Sequenz der Patienten. Die mutierten Basen sind im degenerierten Code dargestellt: „R“ steht für Base A bzw. G; „Y“ steht für Base C bzw. T; „W“ steht für Base A bzw. T.

### 3.2.6 Untersuchung des *PKP2* Gens

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der kardialen Desmosome ist das Plakophilin-2. Es gehört zu den Armadillo Proteinen und wird vom Gen *PKP2* codiert. Im Rahmen der Diplomarbeit von Elisa Fehlberg-Viering wurde die Untersuchung des Gens im Institut für Rechtsmedizin Frankfurt etabliert und anschließend in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Diplomarbeit, welche sechs ARVC Patienten umfasst, und die Ergebnisse der weiteren Untersuchungen dargestellt.

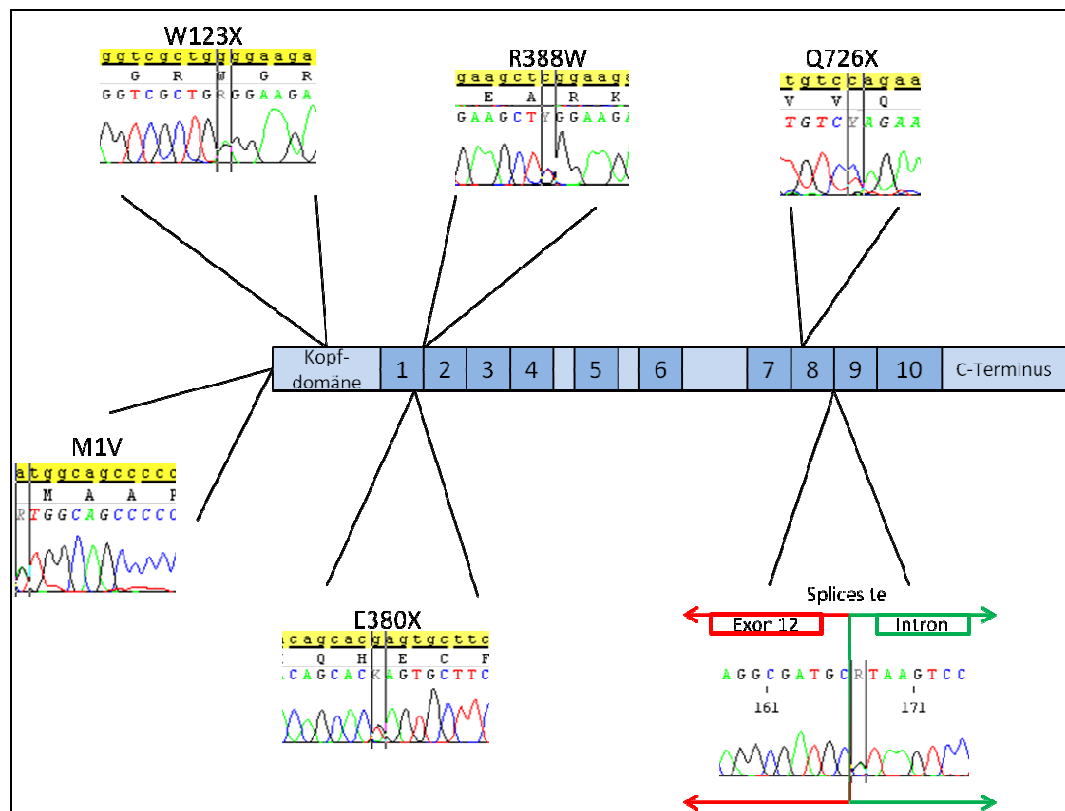
Insgesamt wurden 16 Patienten mit ARVC oder mit Verdacht auf ARVC untersucht. Bei sechs Patienten konnten Sequenzänderungen festgestellt werden, wovon vier noch nicht beschrieben sind (Abb. 3.32).



**Abb. 3.32: Elutionsdiagramme der neuen Mutationen des *PKP2* Gens.** Rot: Probe des jeweiligen Patienten. Schwarz: Kontroll-Proben.

Diese wurden ebenfalls mittels dHPLC anhand von 200 Proben gesunder Kontrollpersonen untersucht, um die Häufigkeit dieser Varianten festzustellen. Vier Sequenzvarianten konnten in keiner Kontrolle gefunden werden, somit kann man sie als Mutation betrachten.

Die Mutation M1V betrifft das Startcodon ATG. An der ersten Base kommt es zu einem heterozygoten Austausch von Adenin zu Guanin, wodurch sich das Start-Methionin zu Valin ändert, und somit der Start der Translation gestört ist.



**Abb. 3.33.: Übersicht über die gefundenen Pklakophilin-2 Mutationen.** Drei Mutationen befinden sich in der Kopfdomäne. Die weiteren Mutationen befinden sich in den Armadillo-Motiven 1 und 8. „X“ zeigt an, dass die Mutation zu einem Stopp-Codon führt und kein vollständiges Protein entsteht. Dargestellt ist die längere PKP2b Isoform. Die Insertion ist als Armadillo Motiv eingefügt, so dass insgesamt 10 Armadillo Motive vorhanden sind. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt. Darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz und die Basen-Sequenz der Patienten. Die mutierten Basen sind im degenerierten Code dargestellt: „R“ steht für Base A bzw. G; „Y“ steht für Base C bzw. T; „K“ steht für Base G bzw. T.

In der Kopfdomäne ist die neue Mutation W123X lokalisiert. Hierbei ändert sich die dritte Base des Triplets TGG zu TGA und führt auf Proteinebene zu einem vorzeitigen Stoppcodon (als X dargestellt), wodurch das Protein Plakophilin-2 nicht komplett synthetisiert wird.

Die beiden neuen Mutationen E380X und R388W befinden sich im ersten Armadillo-Repeat. Wie bei der zuvor beschriebenen Mutation kommt es auch bei E380X zu einem vorzeitigen Stoppcodon. Hier wird die erste Base des Triplets verändert, GAG zu TGA, woraus ein Stoppsignal resultiert. Auch in diesem Fall wird kein vollständiges Protein synthetisiert. Bei der Mutation R388W ist die erste Base des Triplets CGG zu TGG verändert, wodurch auf Proteinebene Glutaminsäure durch Tryptophan ersetzt wird.

Im achten Armadillo-Repeat befindet sich eine weitere neue Mutation (Q726X), wobei sich die erste Base des Triplets CAG zu TAG ändert, was ein Stoppsignal codiert. Auch in diesem Fall kann kein vollständiges Protein synthetisiert werden.

Weiterhin wurde eine Mutation in der Splicesite von Exon 12 zum nachfolgenden Intron gefunden. Die erste Base (G) nach dem Exon ist heterozygot zu (A) mutiert, wodurch die Splicing-Erkennungsstelle (GT) verändert ist.

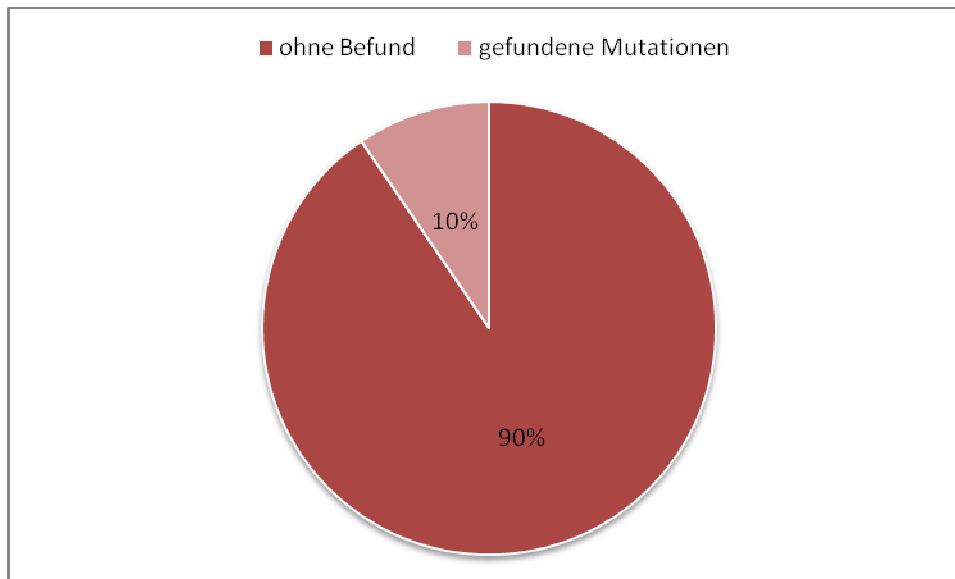
### **3.3 Plötzliche Herztodesfälle**

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Molekulare Grundlagen zur Diagnostik und Ätiologie genetisch bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen als Auslöser des plötzlichen Herztodes“ wurden Blutproben von plötzlich verstorbenen Personen untersucht und nach krankheitsverursachenden Mutationen in den kodierenden Bereichen kardialer Ionenkanal-Gene und in den mit ARVC assoziiert Genen gesucht.

Insgesamt wurden Herzblutproben von 21 Leichen Verstorbener untersucht, bei denen die Obduktion makroskopisch keinerlei Hinweise auf die Todesursache lieferte. Ergänzend wurden mikrobiologische, histologische und toxikologische Untersuchungen durchgeführt, die ebenfalls keine Hinweise erbrachten.

Bei zwei Verstorbenen konnten Mutationen in den untersuchten Genen gefunden werden (Abb. 3.34), die im Einzelnen anschließend beschrieben werden. Die Untersuchung einer weiblichen Toten erbrachte den Nachweis einer Mutation im *SCN5A* Gen in Kombination mit einem Polymorphismus, der ebenfalls im *SCN5A* Gen lokalisiert ist (Tab. 3.2).

Bei der Untersuchung eines männlichen Toten konnte im *KCNJ2* Gen eine neue Mutation nachgewiesen werden.



**Abb. 3.34.: Prozentualer Anteil der nachgewiesenen Mutationen innerhalb des untersuchten Leichenkollektivs.** Es konnte bei zwei der 21 Toten Mutationen nachgewiesen werden.

Gen	Exon	Mutation	Status
<i>SCN5A</i>	12	H558R (Polymorphismus)	bekannt
	28	I1768V	bekannt
<i>KCNJ2</i>		A371G	neu

**Tabelle 3.2.: Übersicht über die gefundenen Mutationen innerhalb des Leichenkollektivs.** Es konnten eine neue und zwei bekannte Mutationen identifiziert werden.

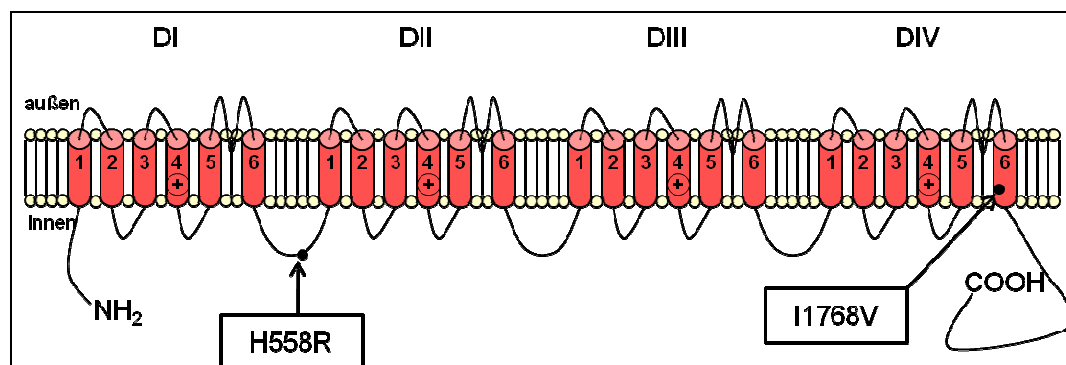
### 3.3.1 *SCN5A* Mutationen I1768V und H558R

Vorgeschichte:

Eine 33-jährige Frau kollabierte während einer Lokalanästhesie der behandelnden Zahnärztin. Die Zahnärztin begann direkt mit einer Herzmassage und beatmete die Patientin mit Sauerstoff. Der herbeigerufene Notarzt stellte Kammerflimmern fest und begann sofort mit Reanimationsmaßnahmen. Die Patientin wurde in ein Krankenhaus überführt und noch zwei weitere Stunden erfolglos reanimiert.

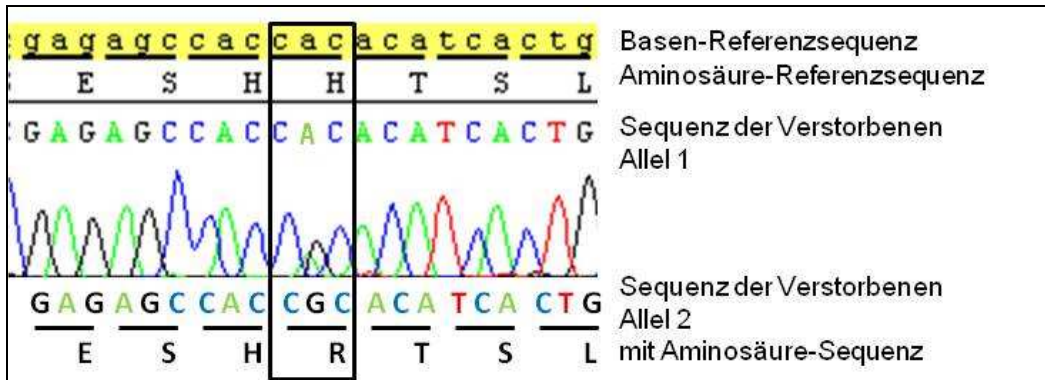
Während der Obduktion (SN367/07) konnten keine auffälligen Organveränderungen festgestellt werden. Das Herz war mit 410 Gramm etwas größer als normal, was aber nicht als Todesursache in Betracht gezogen werden kann. Die histologische Untersuchung vom Herz, der Koronararterien und des Gehirns zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten. Toxikologisch wurde lediglich das Lokalanästhetikum Ultracain nachgewiesen. Aufgrund dieser negativen Ergebnisse wurde ein genetisches Screening der LQTS und CPVT relevanten Gene veranlasst.

Bei der molekulargenetischen Untersuchung konnte im *SCN5A* Gen eine bekannte Mutation und ein bereits bekannter Polymorphismus nachgewiesen werden (Abb. 3.35).



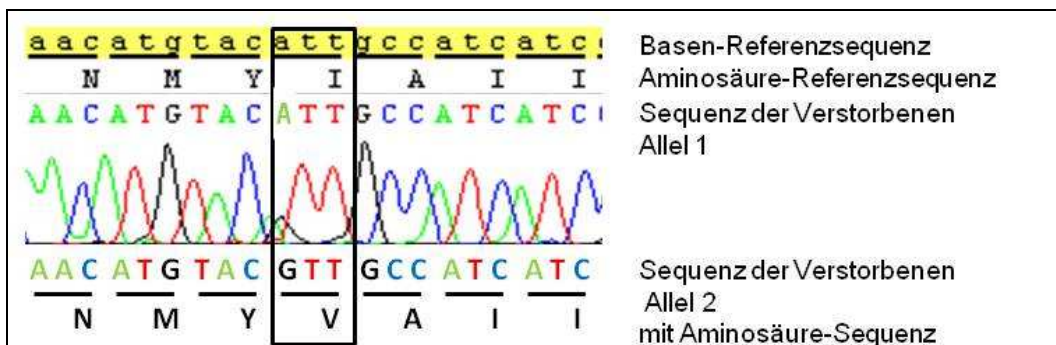
**Abb. 3.35: Schematische Darstellung der Lokalisation der beiden *SCN5A* Mutationen im Na<sub>v</sub>1.5 Kanal.** Der Polymorphismus H558R befindet sich im DI-DII Linker; die Mutation I1768V ist in Domäne IV in Segment 6 lokalisiert.

Der Polymorphismus H558R befindet sich in Exon 12 des *SCN5A* Gens und ist im DI-DII-Linker des Proteins lokalisiert. Es handelt sich um einen heterozygoten Basenaustausch von CAC zu CGC, was zu einer Aminosäuresubstitution von Histidin durch Arginin führt (Abb. 3.36).



**Abb. 3.36.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der plötzlich verstorbenen Frau.** Gezeigt wird der Polymorphismus H558R. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Verstorbenen.

Die weitere Mutation I1768V ist im Exon 28 des *SCN5A* Gens lokalisiert. Im Protein befindet sich diese Mutation in Domäne DIV der Transmembrandomäne S6. Auch diese Sequenzänderung ist heterozygot, bei der ATT zu GTT verändert wird und die Substitution von Isoleucin durch Valin zur Folge hat (Abb. 3.37).



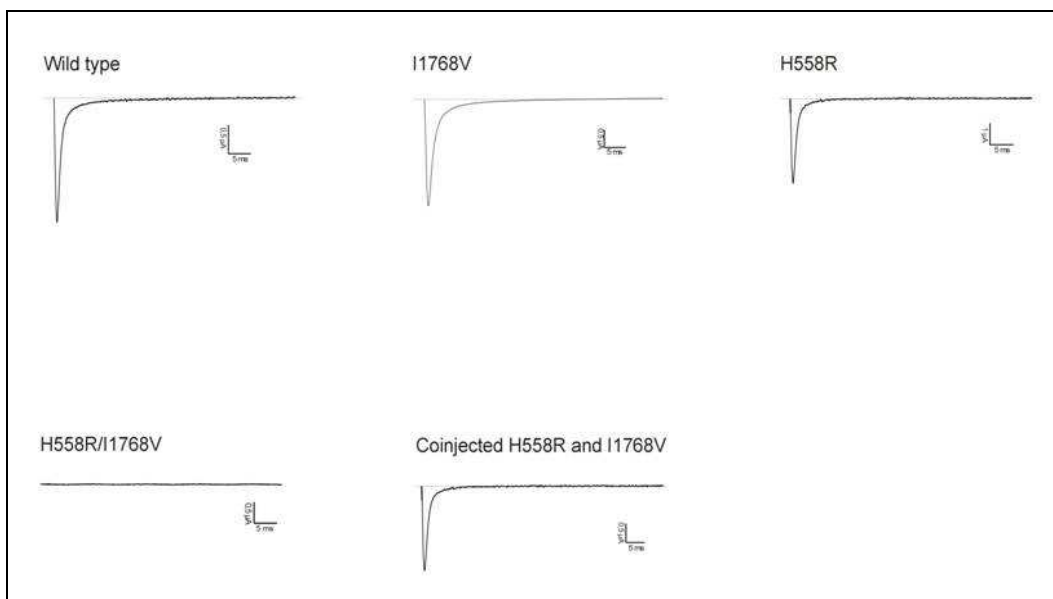
**Abb. 3.37.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der plötzlich verstorbenen Frau.** Gezeigt wird die Mutation I1768V. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Verstorbenen.

Beide Veränderungen sind in der Literatur beschrieben (Viswanathan et al, 2003, Groenewegen et al, 2003), jedoch wurden sie noch nicht gemeinsam bei



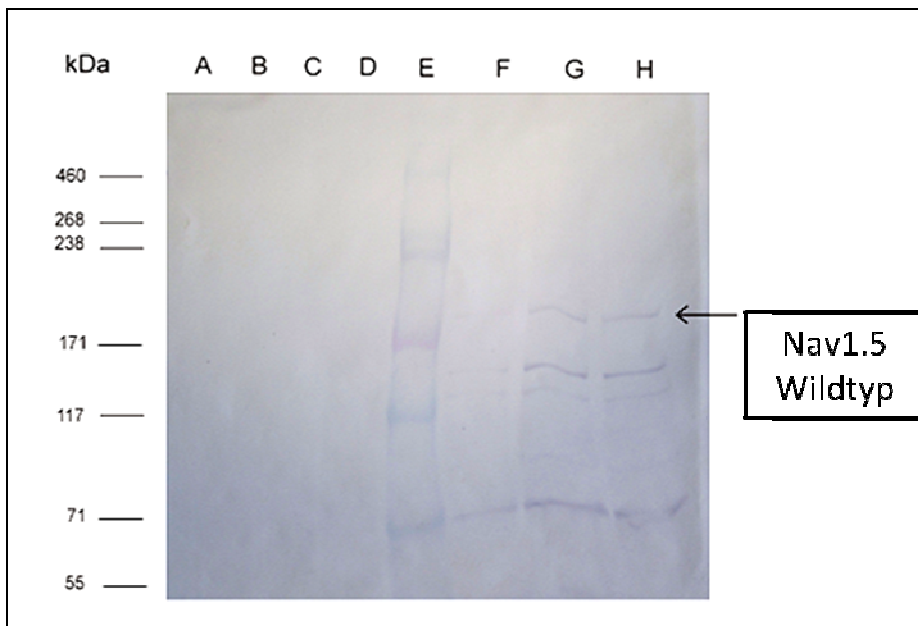
Patienten oder plötzlichen Herztodesfällen gefunden. Von Polymorphismen ist bekannt, dass sie regulatorisch auf Mutationen im gleichen Gen wirken können (Viswanathan et al, 2003). Aus diesem Grund wurden Untersuchungen im Oozytenexpressionssystem durchgeführt.

Da Polymorphismus und Mutation auf der DNA durch 3630 Basen (1210 Aminosäuren) voneinander getrennt sind, konnte nicht in einem Schritt sequenziert werden. Somit war fraglich, ob Polymorphismus und Mutation auf einem Allel oder auf unterschiedlichen Allelen liegen. Zunächst wurde mittels Site-Directed Mutagenese eine Mutante hergestellt, die sowohl I1768V als auch H558R auf einem Allel besitzt. Parallel wurden beide Varianten einzeln hergestellt. In Kooperation mit dem Labor Tytgat (Leuven, Belgien) wurde die RNA der Doppelmutante in *Xenopus* Oozyten injiziert, jedoch wurden diese Doppelmutanten nicht exprimiert. Es wurden verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  und 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) und Inkubationszeiten (2 - 4 Tage) angewandt, die jedoch nicht zur Expression des doppelt mutierten Kanals führten.



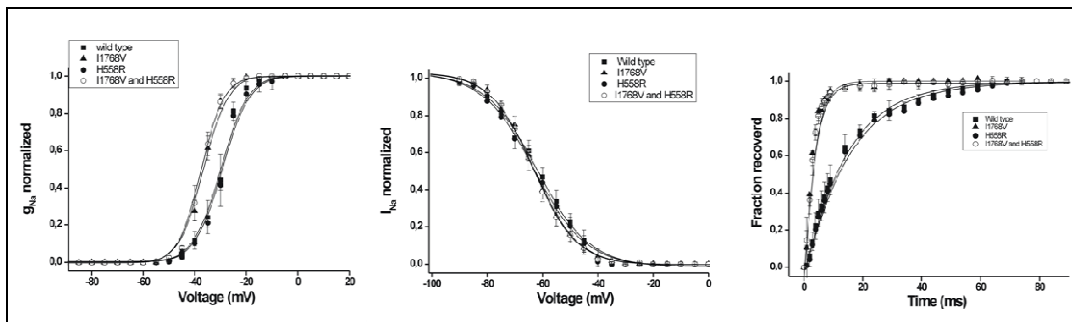
**Abb. 3.38: Initialströme der Zwei-Elektroden-Voltage Messung.** Der Wildtyp wurde in den Oozyten exprimiert und zeigte einen normalen Ionenstrom über die Membran. Die Mutation I1768V wurde ebenfalls gut exprimiert, zeigte einen etwas schwächeren Ionenstrom als der Wildtyp. Ebenso der Polymorphismus H558R. Die Doppelmutante H558R/I1768V wurde nicht in den Oozyten exprimiert und folglich konnten keine Ionenströme gemessen werden. Die Co-injizierte Variante H558R + I1768V wurde exprimiert und konnte im Vergleich zum Wildtyp einen schwächeren Ionenstrom generieren.

Zur Fragestellung, ob der Kanal nicht exprimiert wird, wurden mittels Westernblot und humanen Nav<sub>v</sub>1.5 Antikörpern weitere Untersuchungen im Labor Tytgat durchgeführt. Im Vergleich zum Nav<sub>v</sub>1.5 Wildtyp Kanal wurde die Doppelmutante geblottet und festgestellt, dass keine Expression in den *Xenopus* Oozyten stattgefunden hat (Abb. 3.39). Es scheint sich somit um eine letale Mutation zu handeln.



**Abb. 3.39.: Immunoblot der Doppelmutante I1768V+H558R.** In Spur A-D ist die Mutante aufgetragen, In Spur E befindet sich der „high molecular weight standard“ - Marker, Spur F-H beinhaltet den Wildtyp. Die Doppelmutante zeigt keine Expression und konnte nicht mittels der spezifischen humanen Nav1.5 Antikörper detektiert werden.

In einem weiteren Schritt wurde die RNA der Einzelmутanten in die Oozyten in einem Verhältnis von 1:1 co-injiziert. Nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen konnten Ionenströme gemessen werden. Hierbei zeigte sich bei der Co-Injektion von H558R und I1768V, dass beide DNA-Veränderungen zusammen zu einer schnelleren Aktivierung des Kanals führen. Ebenfalls beschleunigt ist die Recovery-Zeit des Kanals. In der Inaktivierung des Kanals kommt es zu keiner Veränderung (Abb. 3.40).



	Wildtyp	I1768V	H558R	Co-Injektion I1768V+H558R
<b>Aktivierung</b> <b>V<sub>1/2</sub> (mV)</b>	-29,89 +/- 0,19	-36,59 +/- 0,0049	-27,34 +/- 0,17	-37,02 +/- 0,063
<b>Inaktivierung</b> <b>V<sub>1/2</sub> (mV)</b>	-61,98 +/- 0,54	-63,09 +/- 0,20	-62,98 +/- 0,63	-63,63 +/- 0,16
<b>Recovery</b> <b>tau (ms)</b>	13,38 +/- 6,55	3,14 +/- 4,77	15,25 +/- 9,18	3,21 +/- 4,61

**Abb. 3.40.: Spannungskurven des Nav1.5 Wildtyps und der Nav1.5 Mutanten.** Getestet wurden die Einzelmутanten I1768V und H558R sowie beide Varianten im Verhältnis von 1:1 co-injiziert (I1768V+H558R). H558R allein unterscheidet sich nicht vom Wildtyp. I1768V reagiert in Aktivierung und Recovery schneller als der Wildtyp. Die Doppelmutante, bei der I1768V und H558R getrennt injiziert wurde, unterscheidet sich vom Wildtyp in einer schnelleren Aktivierung und schnelleren Recovery.

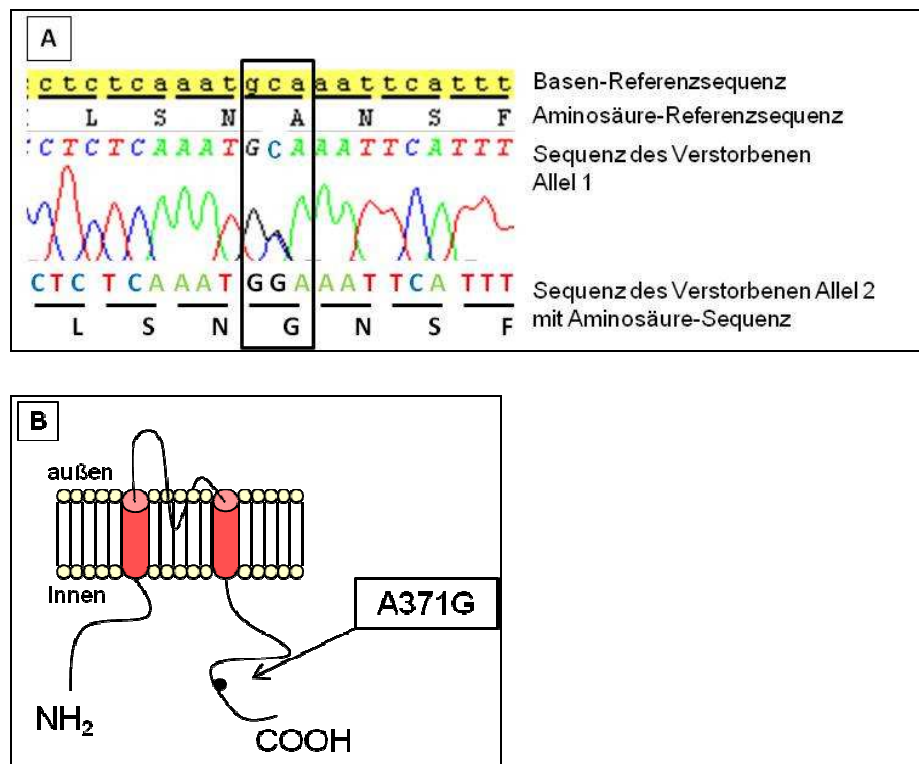
### 3.3.2 KCNJ2 Mutation A371G

Vorgeschichte:

Ein 19-jähriger Mann wurde morgens tot in seinem Zimmer im elterlichen Wohnhaus aufgefunden. Der Leichnam wurde in der Rechtsmedizin Köln (L0010/05) obduziert, jedoch konnte makroskopisch keine Todesursache festgestellt werden. Durch die toxikologische Untersuchung konnten bis auf geringe Konzentrationen von Cannabinoiden keine Medikamentenrückstände, oder Alkohol- oder Drogenmissbrauch nachgewiesen werden. Zur Vorgeschichte war bekannt, dass der Verstorbene zuvor in Maastricht war und dort auch Mit-

Konsument dreier Joints war. Mikrobiologische Untersuchungen verliefen ebenfalls negativ.

Den Angehörigen wurde ein genetisches Screening empfohlen, welches die LQTS und ARVC relevanten Gene beinhaltet. Hierbei konnte in dem *KCNJ2* Gen, welches den einwärts gleichgerichteten Kaliumkanal Kir2.1 codiert, eine Sequenzveränderung gefunden werden (Abb. 3.41). In dem Triplet GCA, welches die Aminosäure Alanin codiert, ist die zweite Base heterozygot mutiert. Die Folge ist ein Aminosäureaustausch im Protein von Alanin zu Glycin in Position 371, welche sich in C-Terminus befindet.



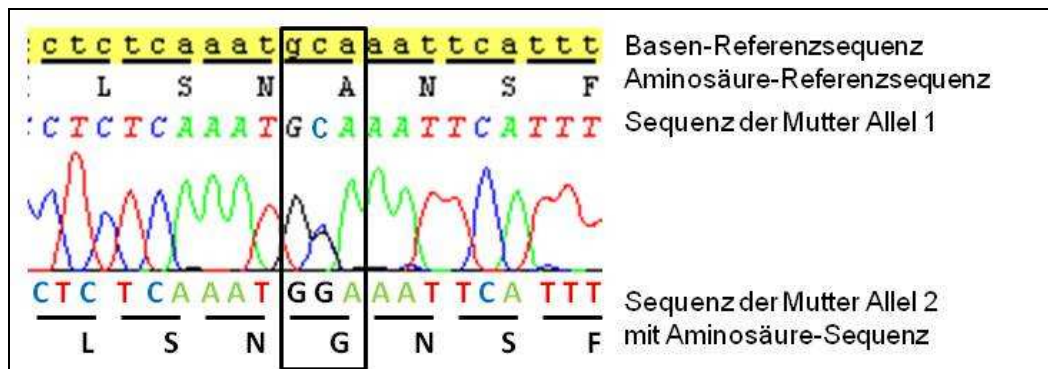
**Abb. 3.41.: A) Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des *KCNJ2* Gens des Toten.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz des Verstorbenen. B) Lokalisation der Mutation im Kir2.1 Kanal.

Um die Häufigkeit dieser Sequenzveränderung festzustellen, wurden Untersuchungen mittels Direktsequenzierung durchgeführt. Proben von 200 gesunden Kontrollpersonen wurden auf diese *KCNJ2* Veränderung (A371G) hin

untersucht. Hierbei konnte sie bei keiner Kontrolle gefunden werden, so dass sie als Mutation anzusehen ist.

Die Mutter des Verstorbenen klagte bereits über Herzrhythmusstörungen, so dass sie sich aufgrund des Befundes ihres Sohnes kardiologisch untersuchen ließ. In der Kerckhoff Klinik konnte keine eindeutige Diagnose gestellt werden. Es wurde die Verdachtsdiagnose LQTS gestellt und zur Absicherung eine Blutprobe genetisch untersucht.

Bei dieser Untersuchung wurde zunächst nur das *KCNJ2* Gen untersucht. Hierbei konnte die gleiche Mutation wie beim verstorbenen Sohn nachgewiesen werden (Abb. 3.42).



**Abb. 3.42.: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des *KCNJ2*-Gens der Mutter des Verstorbenen.** Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Mutter des Verstorbenen.

In der Familie gibt es noch weitere Geschwister des Verstorbenen sowie Nichten und Neffen. Diese werden sich in näherer Zukunft ebenfalls genetisch untersuchen lassen, um eine Risikoeinschätzung zu erhalten und gegebenenfalls präventiv behandelt zu werden.

Um diese neue Mutation zu charakterisieren werden derzeit Versuche zur Elektrophysiologie vorbereitet. Diese liefern endgültige Beweise, ob diese Mutation todesursächlich gewesen ist.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Institut für Rechtsmedizin am Universitätsklinikum in Frankfurt ein molekulares Screening Programm zur Untersuchung genetisch bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen etabliert. Als Material diente Blut von Personen, die an einem mutmaßlichen plötzlichen Herztod verstarben sowie Blutproben von Patienten der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim, die an einer zum Teil definierten Herzkrankheit leiden. Es wurden Gene untersucht, die sowohl kardiale Ionenkanäle als auch Proteine des kardialen Zell-Zell-Kontakts codieren und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Herzrhythmusstörungen spielen.

### 4.1 Zur Methodik

Blutproben von Verstorbenen und von Patienten wurden molekular-genetisch untersucht. Die DNA Amplifikation wurde mit bereits beschriebenen und mit selbst konzipierten Primern durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die PCR mit einem Temperaturgradienten angewandt. Diese Methode erlaubt, parallel verschiedene Annealing-Temperaturen auszuprobieren. In der Regel wurde die Annealing-Temperatur im Temperaturgradient zwischen 56 °C und 66 °C gewählt, so dass am Ende für jedes Primerpaar eine spezifische Temperatur etabliert werden konnte. Die meisten Gene sind im 5'UTR Bereich bis hin zum Exon 1 sehr GC-reich, wodurch viele Primer in dieser Region schlecht binden. In solchen Fällen kann man dem PCR-Puffer verschiedene Zusätze beifügen. Besonders in einigen Genen (*KCNH2*, *KCNQ1*, *PKP2*, *DSG2*) bildete die Amplifikation des Exon 1 eine große Herausforderung. Gelöst wurde das Problem, in dem der PCR Glycerin und Formamid oder DMSO zugefügt wurde. Glycerin stabilisiert die Taq DNA-Polymerase während der PCR und erhöht die Ausbeute. Formamid und DMSO wirken denaturierend und verhindern dadurch unspezifisches Binden der Primer an die DNA.

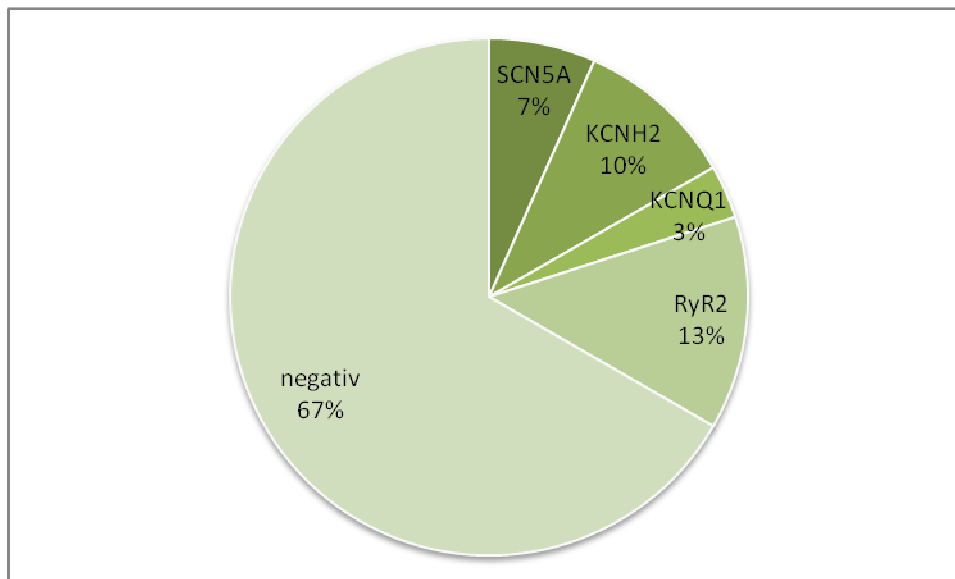
Aufgrund des zunehmenden Probeneingangs und der zeitaufwendigen Analyse-methode wurde nach einer schnellen Vor-Sceeningmethode gesucht. Die denaturierende HPLC (dHPLC; denaturing high performance liquid chromatography) eignet sich für diesen Zweck besonders. Bei der Etablierung

dieser Methode konnten für das Ryanodin Rezeptor-Gen in der Literatur dHPLC-Parameter (Temperatur, Pufferkonzentrationen) gefunden werden (Tiso et al, 2001). Leider war dies nicht für alle Gene möglich, wodurch sich die Etablierung für die restlichen Gene als schwierig erwies. In der Regel ist es hilfreich, wenn in den zu etablierenden PCR-Produkten bereits heterozygote Sequenzveränderungen vorliegen, wobei man die Temperatur wählt, bei der man deutlich die Heteroduplices im Chromatogramm erkennen kann. Liegt eine homozygote Mutation vor, so gibt es verschiedene Pipettierschemata, bei denen z.B. eine Wildtyp-Probe in die zu untersuchende Probe gemischt wird. Da es sich bei den strukturellen und primär elektrischen Herzerkrankungen allerdings um autosomal-dominant vererbte Krankheiten handelt und nur ein sehr geringer Prozentsatz (ca. 1%) homozygot vorkommt, wurde auf ein Pipettierschema, wie zuvor beschrieben, zunächst verzichtet.

## 4.2 Untersuchung von Patienten

### 4.2.1 Patienten mit primär elektrischen Herzerkrankungen

Abbildung 4.1 zeigt die Verteilung der Patienten mit diagnostizierten primär elektrischen Herzerkrankungen. In 33 % der Proben (n=29) konnten Mutationen in den Ionenkanalgenen gefunden werden. 67 % erbrachten einen negativen Befund. In der vorliegenden Arbeit wurden bislang die am häufigsten betroffenen Gene untersucht. Hierzu zählen die beiden Kaliumkanalgene *KCNH2* und *KCNQ1* mit den jeweiligen  $\beta$ -Untereinheiten MinK (*KCNE1*) und MiRP1 (*KCNE2*) sowie der für das Ruhepotential verantwortliche Kaliumkanal Kir2.1 (*KCNJ2*). Der depolarisierende Natriumkanal Na<sub>v</sub>1.5 (*SCN5A*) und der Calcium-abhängige Ryanodin Rezeptor (*RyR2*) wurden ebenfalls untersucht.



**Abb. 4.1.: Patientenkollektiv mit primär elektrischer Herzerkrankung.** Bei 33 % der untersuchten Patienten konnten genetische Veränderungen in den kardialen Ionenkanalgenen nachgewiesen werden.

Wird bei der genetischen Untersuchung eine krankheitsauslösende Mutation gefunden, wird den betroffenen Personen eine genetische Beratung angeboten. Da es sich bei diesen Krankheitsbildern um vererbte Krankheiten handelt, können Familienangehörige ebenfalls Träger einer solchen Mutation sein. Nach eingehender genetischer Beratung können die Angehörigen ebenfalls molekular-genetisch und kardiologisch untersucht und vor einem plötzlichen Herztod geschützt werden.

Es gibt noch weitere sechs Gene, die ebenfalls für das Auftreten von Herzrhythmusstörungen verantwortlich sein können, die zum Teil sehr groß sind und bei denen die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen vorkommen, unter 1 % liegt. Diese Gene (*ANK2*, *CACNA1C*, *SCN4B*, *CAV3*, *SNTA1* und *AKAP9*) wurden nicht untersucht. Somit könnte ein Teil der negativen Befunde darauf zurückzuführen sein, dass zum einen keine Mutationen vorhanden waren oder zum anderen, dass Mutationen in den nicht untersuchten Genen vorlagen. Desweiteren kommen fortlaufend neue Gene in den Datenbanken (Inherited Arrhythmias Database, Human Genome Variation Society) hinzu, so dass es auch denkbar ist, dass sich Mutationen in Genen befinden, die bis jetzt noch nicht bekannt bzw. noch nicht mit dem Krankheitsbild assoziiert sind.



#### 4.2.1.1 Mutationen im *SCN5A* Gen

##### 4.2.1.1.1 *SCN5A* Mutation R1193Q

Ein vietnamesischer Mann wurde aufgrund nächtlicher Palpitationen in der Kerckhoff Klinik vorstellig. Die Kardiologen konnten mit Hilfe eines Ajmalintests ein Brugada Syndrom (BrS) demaskieren. Dieser Test wird bei unklarer BrS Diagnose durchgeführt, da Ajmalin ein Natriumkanal Blocker ist und gezielt an diesen Ionenkanälen angreift (Rolf et al, 2003). Dennoch war die Diagnose nicht zu 100 % eindeutig, da bei Gabe der Volldosis Ajmalin beim Patienten Kammerflimmern auftreten müsste. Dies war bei dem Patienten nicht der Fall. Zur Bestätigung der Brugada Syndrom Diagnose wurde daher ein genetisches Screening durchgeführt. Hierbei konnte eine bereits bekannte Mutation (R1193Q) im kardialen *SCN5A* Gen, welches den spannungsabhängigen Natriumkanal am Herzen codiert, gefunden werden. Im DII-DIII Linker des Proteins, an Position 1193, wird die stark basische Aminosäure Arginin (R) durch die neutrale Aminosäure Glutamin ausgetauscht. Diese Neutralisation einer stark basischen Aminosäure in einem stark konservierten Bereich des Natriumkanals kann funktionelle Auswirkungen auf das Protein haben (Abb. 4.2). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der DII-DIII Linker des Kanals sowohl an der Aktivierung, als auch an der Inaktivierung beteiligt ist (Camacho et al, 2006).

SCN5A_homo_Ex20	GGGAAGGTCTGGTGG <b>CGG</b> TTGCGCAAGACCT
SCN5A_canis	GGGAAGGTCTGGTGG <b>CGA</b> CTGCGCAAGACCT
SCN5A_bos	GGGAAGGTCTGGTGG <b>AGG</b> CTGCGCAAGACCT
SCN5A_mus	GGGAAGGTCTGGTGG <b>AGA</b> CTGCGCAAGACCT

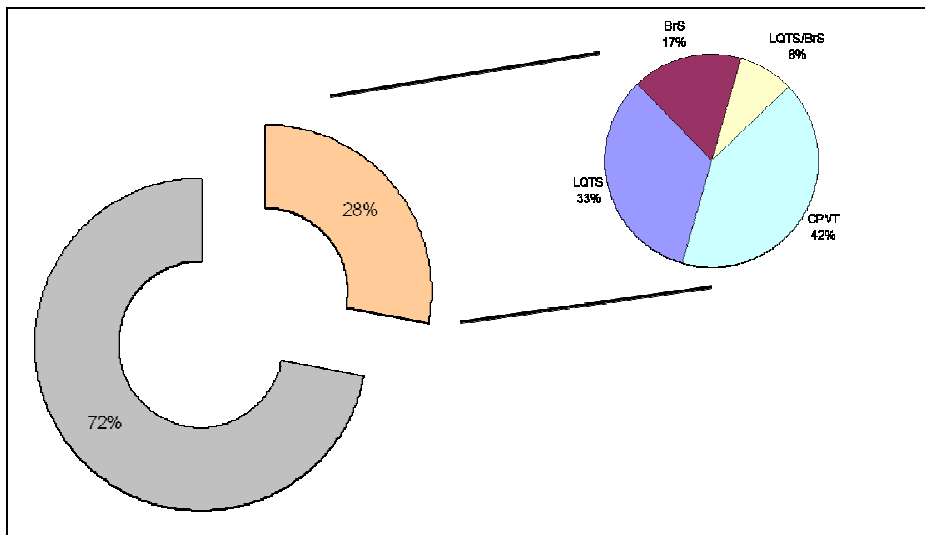
**Abb. 4.2.: Ausschnitt aus der Basensequenz des Exon 20 des *SCN5A* Gens.** Mit dem Programm ClustalW wurden die Sequenzen von Mensch (homo), Hund (canis), Rind (bos) und Maus (mus) verglichen. Auch wenn die Basenabfolge im Triplet nicht identisch ist, codieren doch alle drei Triplets die Aminosäure Arginin.

Diese Mutation ist in der Literatur in Zusammenhang mit verschiedenen Herzkrankheiten beschrieben. 2003 bereits wurde sie bei einem japanischen Brugada Syndrom Patienten nachgewiesen (Takahata et al, 2003). Das Brugada Syndrom kann im EKG durch eine ST-Streckenerhebung, die zu Herzrhythmusstörungen führt, nachgewiesen werden und kann unbehandelt zum

plötzlichen Herztod führen. Auch Vatta et al (2002) brachte diese Mutation mit dem Brugada Syndrom in Verbindung (Vatta et al, 2002). Elektrophysiologische Versuche ergaben, dass der Kanal schneller inaktiviert wird, wodurch weniger Natrium in die Zelle strömt und daraus ein Brugada Syndrom resultiert. Wang et al., (2004) jedoch wies diese Mutation in einem Patienten mit erworbenem Long QT Syndrom nach (Wang et al, 2004). Elektrophysiologische Untersuchungen ließen darauf schließen, dass sich die mutierten Natriumkanäle verzögert öffnen, was zu einem LQT3 Syndrom führt. Darüber hinaus konnten Wang et al. (2004) bei diesem LQTS Patienten den Polymorphismus H558R nachweisen, der zwar mit 20% in der gesunden Bevölkerung vorkommt, aber dennoch auf andere Mutationen regulatorisch wirken kann. Hwang et al (2005) berichtete, dass die *SCN5A* Mutation R1193Q sowohl Brugada Syndrom als auch LQTS auslösen kann. Entscheidend scheinen der ethnische Hintergrund und Lebensumstände eine Rolle zu spielen. Auch können weitere Mutationen und/oder Polymorphismen regulatorisch mit der Mutation wirksam werden (Hwang et al, 2005).

Im hier untersuchten Fall konnte eine klinische Brugada Syndrom Diagnose mit Hilfe des genetischen Screenings untermauert werden, zumal der Polymorphismus H558R nicht bei dem Patienten gefunden wurde, und somit ein LQTS genetisch ausgeschlossen werden konnten. Der Patient wird derzeit entsprechend medikamentös behandelt, um ihn bestmöglich vor einem plötzlichen Herztod zu schützen.

Tan et al., (2005) untersuchten die direkten Verwandten von Personen, die an einem plötzlichen Herztod verstarben, kardiologisch und genetisch. Diese Probanden wurden aus wissenschaftlichem Interesse und freiwillig untersucht, ohne dass sie Beschwerden hatten. Hierbei zeigte sich, dass 28 % der direkten Verwandten an einer noch unerkannten Herzrhythmusstörung litten (Abb. 4.3). Das Brugada Syndrom nimmt in dieser Studie mit nur 17 % einen kleineren Teil ein, dennoch ist es eine ernstzunehmende Krankheit mit hohem Mortalitätsrisiko.



**Abb. 4.3.: Untersuchung von direkten Verwandten von Personen mit plötzlichem Herztod.**

Bei 28 % der untersuchten Familienangehörigen konnten genetische Veränderungen gefunden werden, die in Verbindung mit primär elektrischen Herzerkrankungen (Long QT Syndrom (LQTS), Brugada Syndrom (BrS), Katecholaminerge polymorph-ventrikuläre Tachykardie(CPVT)) gebracht werden (verändert nach Tan et al, 2005).

Da es sich um eine vererbare Krankheit handelt, und der Patient fünf Kinder hat, wurden diese auf Wunsch des Patienten ebenfalls einem Screening unterzogen. Hierbei konnte die Mutation bei drei Kindern nachgewiesen werden. Die Kinder werden nun kardiologisch beobachtet, und sobald erste Anzeichen oder Komplikationen auftreten medikamentös behandelt. Generell ist die Behandlung nicht für das Brugada Syndrom spezifisch, sondern allgemein eine Herzinsuffizienzbehandlung, wobei ACE-Hemmer und  $\beta$ -Blocker und Diuretika zur Anwendung kommen.

#### 4.2.1.1.2 SCN5A Mutation E1053K

Aufgrund von Herzrhythmusstörungen und einer Synkope mit Verletzungsfolge wurde ein 38-jähriger Mann kardiologisch untersucht. Das EKG und das MRT erbrachten keine eindeutige Diagnose, worauf ein genetisches Screening der Long QT Syndrom relevanten Gene durchgeführt wurde. Bei dieser

Untersuchung konnte eine Mutation in Exon 17 des *SCN5A* Gens nachgewiesen werden. An Position 1053 wird die saure Aminosäure Glutaminsäure durch die basische Aminosäure Lysin ersetzt. Diese Mutation befindet sich im DII-DIII Linker des Proteins, welcher sowohl an der Aktivierung als auch an der Inaktivierung des Kanals beteiligt ist (Camacho et al, 2006). In diesem Fall handelt es sich um eine bekannte Mutation, die bei Brugada Syndrom Patienten gefunden und mit dem Krankheitsbild korreliert wurde (Priori et al, 2000). In dieser Studie konnten acht neue *SCN5A* Mutationen in den untersuchten Patienten detektiert werden, unter anderem die Mutation E1053K. Die Studie zeigt eine Korrelation zwischen Mutation und Krankheit, da 400 gesunde Kontrollpersonen nicht Träger dieser Mutation sind. Ebenso wurden 200 Long QT Syndrom Patienten untersucht, bei denen ebenfalls nicht die Mutation nachgewiesen werden konnte. In einer weiteren Studie wurden die Auswirkungen der Mutante auf die Myocyten und die Herzrhythmusstabilität untersucht (Mohler et al, 2004). Hierbei wurde festgestellt, dass sich die Mutation E1053K im Bindemotif für Ankyrin-G befindet, welches für die Fixierung des Kanals in der Membran verantwortlich ist (Abb. 4.4). Ankyrin-Proteine verknüpfen Membranproteine mit dem Zytoskelett und sorgen dadurch für die Positionierung in der Membran.

Nav1.1	VPIAVGESD
Nav1.2	VPIALGESD
Nav1.4	VPIASGESD
Nav1.5	VPIAVGESD
Nav1.6	VPIAVGESD
E1053K	VPIAVGKSD

**Abb. 4.4.: Ankyrin-G Bindemotif in Exon 17 der humanen Natriumkanäle.** Nav1.1 neuronaler Natriumkanal, Nav1.2 wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, Nav1.4 kommt im Skelettmuskel überwiegend vor, Nav1.5 ist der kardiale Natriumkanal, Nav1.6 kommt in den meisten elektrisch erregbaren Zellen vor. In allen humanen Natriumkanälen ist die Glutaminsäure hoch konserviert. (verändert nach Mohler et al, 2004)

Im HEK293 Expressionssystem konnte festgestellt werden, dass die Mutation den Kanal in seiner Funktion nicht beeinflusst, jedoch wird die Bindung zwischen dem Natriumkanal und Ankyrin-G geschwächt. Dadurch kann sich der Natriumkanal nicht so stark an der Zellmembran anhäufen. Das Resultat ist eine geringe Anzahl an Natriumkanälen an der Zellmembran der Myocyten, wodurch

weniger Natrium während der Depolarisation in die Zelle gelangten, und dadurch das Brugada Syndrom ausgelöst werden könnte (Mohler et al, 2004).

Aufgrund dieser Studien von Priori et al. (2000) und Mohler et al. (2004) wurde die Mutation nicht weiter charakterisiert, sondern den Kardiologen empfohlen erneut auf Brugada Syndrom zu untersuchen. Der Patient erhielt aufgrund der Synkope und der klinischen Untersuchung einen ICD (implantierbarer Cardioverter/Defibrillator) implantiert, da Brugada Syndrom eine hohe Mortalitätsrate aufweist und in einem derart schwerwiegenden Fall prophylaktisch behandelt wird.

#### 4.2.1.1.3 SCN5A Mutation A1186T

Eine 33-jährige Frau erlitt einen Herzstillstand während einer Gastroskopie und wurde reanimiert. Kardiologische Untersuchungen am Herzen ergaben, dass ein Long QT Syndrom vorlag. Aufgrund des Reanimationsereignisses wurde der Patientin ein Defibrillator implantiert. Da die Patientin einen Kinderwunsch angab, wurde ein genetisches Screening der LQTS relevanten Gene durchgeführt, um eine Risikoeinschätzung zu ermöglichen. Bei der molekulargenetischen Untersuchung konnte eine neue Mutation (A1186T) im *SCN5A* Gen, welches den spannungsabhängigen Natriumkanal am Herzen codiert, nachgewiesen werden. Diese Mutation befindet sich im DII-DIII Linker des Proteins, der eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Inaktivierung des Kanals spielt. Hier wird die neutrale und unpolare Aminosäure Alanin durch die neutrale aber polare Aminosäure Threonin ersetzt. Die Mutation befindet sich nicht in dem Ankyrin-G Bindemotif, dennoch ist dieser mutierte Bereich innerhalb verschiedener Arten stark konserviert (Abb. 4.5.).

SCN5A_homo_Ex20	GTGGACACCACACAGGCCCCAGGGAAGGTCTGGTGG
SCN5A_canis	GTGGATACCACACAGGCCCCAGGGAAGGTCTGGTGG
SCN5A_bos	GTGGACACCACACAGGCCACGGAAGGTCTGGTGG
SCN5A_mus	GTGGACACGACGCAGGCCCCAGGGAAGGTCTGGTGG

**Abb. 4.5.: Vergleich des Exon 20 des *SCN5A* Gens zwischen Mensch (Homo), Hund (Canis), Rind (Bos) und Maus (Mus).** In allen vier Arten ist das Triplett GCC (rot), welches die Aminosäure Alanin an Position 1186 codiert, konserviert.

Vergleicht man diesen Bereich des Exon 20 mit anderen humanen Natriumkanälen, so zeigt sich, dass A1186 nicht in den verschiedenen Natriumkanaltypen konserviert ist (Abb. 4.6). Es kann vermutet werden, dass diese Region des Kanals herzspezifisch ist und somit Einfluss auf die Herzfähigkeit hat.

SCN1A_homo	TCAATGTGGAAGAAGGCAGAGGAAAA
SCN2A_homo	TAAGCATAGAAGAAGGCAAAGGGAAA
SCN3A_homo	TAAGTACAGAAGAAGGCAAAGGGGAAG
SCN4A_homo	TGGACATCTCCCAGGGCCGTGGGAAG
SCN5A_homo	TGGACACCACACAGGCCCCAGGGGAAG
SCN7A_homo	TCAGTGGAGCATCCAAGAAAGGAAAA

**Abb. 4.6.: Vergleich des Exon 20 des kardialen SCN5A Gens mit den verschiedenen humanen Natriumkanal-Genen.** SCN1A, SCN2A und SCN3A sind neuronale Formen, SCN4A wird im Skelettmuskel und SCN7A im Uterus exprimiert. Alanin (Triplet in rot dargestellt) an Position 1186 kommt nur in der kardialen Form (SCN5A) vor. In den neuronalen Kanälen und im Skelettmuskel codiert das Triplet (rot) die Aminosäure Glycin. Im Uterus Lysin.

Da es sich um eine neue Mutation handelt, wurden 200 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Keine der Kontrollpersonen ist Träger dieser Mutation, woraus man eine erste Korrelation zwischen Mutation A1186T und Krankheitsbild annehmen konnte. Obwohl beide Aminosäuren neutral sind, unterscheiden sie sich jedoch in ihrer Polarität. Threonin mit seiner OH-Gruppe ist im Vergleich zu Alanin ( $-\text{CH}_3$ ) polar. Hier liegt die Vermutung nah, dass dies Einfluss auf die Kanalfunktion haben könnte. Weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen wurden durchgeführt, um mögliche Auswirkungen der Mutation auf die Funktionalität des Natriumkanals zu prüfen. Im Oozytenexpressionsystem wurde die SCN5A Mutation A1186T im Vergleich zum Wildtypkanal untersucht. In diesen Versuchen wurden die Aktivierung, Inaktivierung und die Recovery-Zeit getestet. Es zeigte sich, dass sich sowohl Aktivierung als auch Inaktivierung nicht vom Wildtypkanal unterscheiden (Abb 3.11). Die Mutation beeinflusst jedoch die Recoveryphase des Natriumkanals. Während dieser Phase sind die Kanäle nicht erneut erregbar und können in der Zeit keine Ionen über die Membran leiten. Bei den elektrophysiologischen Tests konnte gezeigt werden, dass die Recoveryzeit um das 5-fache verkürzt ist (Wildtyp: 21,63  $\pm$  2,03 ms; A1186T: 3,90  $\pm$  1,02 ms). Das bedeutet, dass der Kanal im Vergleich zum Wildtyp fünf Mal schneller wieder aktiviert und dadurch

während der Depolarisationsphase fünf Mal mehr Natriumionen in die Zelle gelangen. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Kanalfunktion, wodurch das kardiale Aktionspotenzial in Phase 0 verlängert wird und ein Long QT Syndrom 3 resultieren kann. Sollte die Patientin ihrem Kinderwunsch nachkommen, so besteht die Möglichkeit, dass die Kinder genetisch untersucht und/oder kardiologisch überwacht werden.

#### 4.2.1.2 Mutationen im *KCNQ1* Gen

##### 4.2.1.2.1 *KCNQ1* Mutation R366Q

Nachdem eine anscheinend gesunde Frau aus völliger Gesundheit Kammerflimmer erlitt und reanimiert werden musste, erfolgte eine kardiologische Untersuchung. Hierbei zeigte sich eine verlängerte QT-Zeit im EKG. Um nähere Informationen zum Long QT Syndrom Typ zu erhalten, wurden im Anschluss die LQTS relevanten Gene untersucht. Hierbei wurde eine bereits bekannte Mutation im *KCNQ1* Gen gefunden. Diese Mutation wurde 2000 beschrieben und bei Patienten mit Long QT Syndrom nachgewiesen (Splawski et al, 2000). Da diese Mutation nicht in 200 gesunden Kontrollpersonen detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Mutation mit dem Krankheitsbild korreliert werden kann (Splawski et al, 2000). Die stark basische Aminosäure Arginin wird an Position 366 des Kaliumkanals K<sub>v</sub>7.1 durch die neutrale Aminosäure Glutamin ersetzt. Da dieser Bereich des C-Terminus innerhalb verschiedener Arten stark konserviert ist, ist davon auszugehen, dass die Ladungsneutralisation einen Einfluss auf die Funktion des Kanals hat und bei einer Mutation zum LQTS führen kann (Abb. 4.7).

KCNQ1_Ex8_homo	CGG <b>C</b> AGATCCCGGCGGCAGCCTCACTCATT <b>C</b> AG
KCNQ1_canis	AGG <b>C</b> AGATCCCGGCGGCAGCCTCGCTCATT <b>C</b> AG
KCNQ1_mus	CGG <b>C</b> AGATCCCAGCTGCAGCCTCACTCAT <b>C</b> AG
KCNQ1_Cavia	CGA <b>C</b> AGATCCCAGCCGCTGCGTCACTCAT <b>C</b> AG

**Abb. 4.7.: Vergleich des Exon 8 des *KCNQ1* Gens zwischen Mensch (Homo), Hund (Canis), Maus (Mus) und Hamster (Cavia).** Auch wenn die Basenabfolge im Triplett (rot) nicht identisch ist, so codieren doch alle drei Triplets die Aminosäure Arginin.

Der Patientin war bereits ein ICD implantiert worden, da sie ein hohes Risiko besaß, erneutes Kammerflimmern mit möglicher Todesfolge zu erleiden.

#### **4.2.1.3 Mutationen im *KCNH2* Gen**

##### **4.2.1.3.1 *KCNH2* Mutation R1047L**

Nachdem eine 48-jährige Frau Präsynkopen und eine Synkope erlitten hatte, wurde sie kardiologisch untersucht. Hierbei wurde mittels eines Ajmalin-Testes ein Brugada Syndrom diagnostiziert. Ein genetisches Screening wurde parallel durchgeführt, in welchem die Long QT Syndrom, CPVT und Brugada Syndrom relevanten Gene untersucht wurden. Hierbei konnte eine Sequenzvariante im *KCNH2* Gen nachgewiesen werden. Im C-Terminus des Proteins, an Position 1047, kommt es zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin durch die neutrale Aminosäure Leucin. Diese Sequenzvariante war sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen gefunden werden (Anson et al., 2004). Somit handelt es sich um einen Polymorphismus. Elektrophysiologische Tests haben gezeigt, dass dieser R1047L Polymorphismus keinen Einfluss auf die Kanalfunktion hat. Da zurzeit nur die häufigsten Gene untersucht werden, ist es möglich, dass noch undetektierte Mutationen in weiteren Genen gefunden werden können.

##### **4.2.1.3.2 *KCNH2* Mutation L69P**

Eine Hochleistungssportlerin klagte nachts und in Ruhephasen nach körperlicher Anstrengung über Schwindel und schnellen Herzschlag. Die klinische Diagnose wies zunächst auf ein Brugada Syndrom hin, einige Jahre später zeigte sich im EKG allerdings eine Verlängerung der QT-Zeit der Patientin, worauf eine genetische Analyse Aufschluss über die Ursache geben sollte. Im *KCNH2* Gen konnte die neue, noch nicht beschriebene Mutation L69P nachgewiesen werden.



In diesem Bereich befindet sich die PAS Domäne, welche von Position 29 bis 69 im Protein lokalisiert ist (Pellequer et al, 1998). Die Abkürzung PAS steht für die Genprodukte *Per*, *Arnt* und *Sim*. Diese Domäne wurde mit der circadianen Rhythmik (Tag-Nacht-Rhythmus) in Verbindung gebracht (Morais Cabral et al, 1998; Pandini & Bonati, 2005). Durch Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, dass die PAS-Domäne an der langsamen Deaktivierung des Kanals mitwirkt. (Chen et al, 1999).

In Position 69 des Proteins wird die neutrale Aminosäure Leucin durch die ebenfalls neutrale Aminosäure Prolin ausgetauscht. Leucin 69 ist bei verschiedenen Arten konserviert und lässt auf einen für den Kaliumkanal wichtigen Bereich schließen (Abb. 4.8).

KCNH2_homo	GAGGTGATGCAGCGACCCCTGCACCTGCGACTTCCTGCAC
KCNH2_bos	GAGGTGATGCAGCGGCCCTGCACCTGCGACTTCCTGCAC
KCNH2_mus	GAGGTGATGCAGCGGCCCTGCACCTGCGATTTCTGCAT
KCNH2_canis	GAGGTGATGCAGCGGCCCTGCACCTGCGACTTCCTGCAC

**Abb. 4.8.: Vergleich des Exon 2 des *KCNH2* Gens zwischen Mensch (Homo), Rind (Bos), Maus (Mus) und Hund (Canis).** In allen vier Arten ist das Triplett CTG (rot), welches die Aminosäure Leucin an Position 69 codiert, konserviert.

Beide Aminosäuren (Leucin und Prolin) sind unpolar, jedoch handelt es sich bei Prolin um eine cyclische Aminosäure, die durch seine sekundäre Amino-Gruppe die Proteinstruktur an dieser Stelle in einer starren Konfiguration hält. Durch seine chemischen Eigenschaften ist Prolin als „Helixbrecher“ bekannt, da aufgrund des fehlenden Wasserstoffs keine H-Brücken ausgebildet werden können (Cordes et al, 2002). Durch die Aufklärung der 3-dimensionalen Struktur des N-Terminus von hERG konnte gezeigt werden, dass sich Leucin an Position 69 in einer  $3_{10}$ -Helix befindet, und dass der N-Terminus an der Deaktivierung des Kanals beteiligt ist (Morais Cabral et al, 1998). Diese  $3_{10}$ -Helix zeichnet sich dadurch aus, dass sie pro Drehung drei Aminosäureseitenketten besitzt und aus zehn Windungen besteht. Wird nun an Position 69 das Leucin durch den „Helixbrecher“ Prolin ersetzt, kann dies gravierende Folgen für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Kanals haben. Mit Hilfe von Deletionsstudien (hERG $\Delta$ 2-373) konnte gezeigt werden, dass dieser N-Terminus nicht an der Inaktivierung

beteiligt ist, sondern Einfluss auf die langsame Deaktivierung nimmt (Schönherr & Heinemann, 1996).

Um zu testen, ob die Mutation L69P die Funktionalität des hERG Kanals beeinflusst, wurden elektrophysiologische Untersuchungen im Oozytenexpressionssystem durchgeführt. Hierbei sollte der mutierte Kanal mit dem Wildtyp Kanal verglichen werden. Allerdings konnten keine Ionenströme gemessen werden. Es wurden RNA Konzentrationen von 1 µg/µL bis 3 µg/µL injiziert. Ebenfalls wurde die Inkubationsdauer von einem Tag auf vier Tage erhöht, was auch keinen Erfolg brachte. Da der Wildtyp Kanal sehr gut exprimiert wurde, konnte ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden. Der mutierte Kanal wurde in einem weiteren Versuch mit dem Wildtyp Kanal co-injiziert. Hierbei konnten Ionenströme gemessen werden, die sich allerdings nicht von den Wildtyp Messungen unterschieden. Dieser Versuch lässt vermuten, dass bei Coinjektion die mutierten und Wildtyp Untereinheiten keine gemeinsamen Heteromere bilden. Es stellte sich die Frage, ob der mutierte Kanal nicht in der Oozyte exprimiert wird, oder ob er exprimiert und nicht in der Membran eingebaut wird. Aus diesem Grund wurden Westernblot-Versuche mit hERG spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierbei zeigte es sich, dass der Kanal nicht exprimiert wird. Es konnten keine hERG Proteine im Zelllysate detektiert werden.

In früheren Untersuchung der PAS Domäne konnte eine wichtige Funktion beschrieben werden: sie spielt eine große Rolle bei der Dimerisierung von Proteinen. Protein-Protein-Interaktionen und Ligand/Cofaktor-Protein-Bindungen gehören mit zu den wichtigsten Funktionen (Pellequer et al, 1998). Da es sich bei hERG um einen Kalium-Ionenkanal handelt, der nur als Tetramer Ionen über die Membran leiten kann, ist anzunehmen, dass in dem Fall der L69P Mutation die Dimerisierung durch die Veränderung der PAS-Domäne gestört ist, und somit der Ionenkanal nicht als Tetramer vorliegt. Dies würde auch erklären, warum der hERG-spezifische Antikörper keinen hERG Kanal detektieren konnte, da dieser nur an das Tetramer bindet und nicht an eine der vier Monomere.

Bei der vorliegenden Mutation handelt es sich um eine heterozygote Mutation. Das bedeutet, dass ein Allel mutiert und das andere Allel der Patientin gesund ist. Physiologisch hat die Patientin somit nicht nur funktionslose, sondern auch funktionsfähige Kanäle in den Myozyten. Da aber ihre Anzahl um 50 % reduziert ist, kommt es zu einem reduzierten Kaliumausstrom, wodurch sich die QT-Zeit im

EKG verlängert und ein Long QT Syndrom resultiert. Aufgrund der Schwere der Symptome wurde der Patientin ein ICD implantiert, mit dem sie weiter Sport betreiben kann.

#### 4.2.1.3.3 *KCNH2* Mutation R883W

Bei einer 47-jährigen Frau stellte sich aus völliger Gesundheit Kammerflimmern ein, und sie musste reanimiert werden. Bei der kardiologischen Untersuchung zeigten sich keine Auffälligkeiten. Da es sich um eine unklare Diagnose handelte, wurde ein genetisches Screening durchgeführt, was zum Nachweis einer Mutation im *KCNH2* Gen, welches den hERG Kaliumkanal am Herzen codiert, führte. Bei dieser Mutation (R883W) kommt es zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin mit der neutralen und aromatischen Aminosäure Tryptophan im C-Terminus des Proteins. Da dieser Bereich des *KCNH2* Gens bei verschiedenen Arten konserviert ist, ist davon auszugehen, dass es sich um einen funktionell wichtigen Bereich handelt (Abb. 4.9).

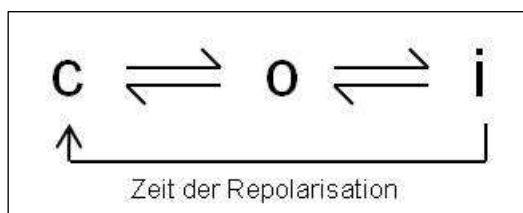
KCNH2_Ex11	GAGTTAGAGGGTGGCTTCAGT <b>CGG</b> CAACGCAAGCGCAAG
KCNH2_mus	GAAC TAGAGAGCGGCTTTAA <b>CAGG</b> CAACGCAAGCGCAAA
KCNH2_canis	GAGCTGGAGGGCGGCTTCAAC <b>AGAC</b> AGCGCAAGCGCAAG
KCNH2_equus	GAGCTGGAGGGCGGCTTCAAC <b>CGG</b> CAACGCAAGCGCAAG

**Abb. 4.9.: Vergleich des Exon 11 des *KCNH2* Gens zwischen Mensch (Homo), Pferd (Equus), Maus (Mus) und Hund (Canis).** Auch wenn die Basenabfolge im Triplet (rot) nicht identisch ist, codieren doch alle drei Triplets die Aminosäure Arginin.

Um nachzuweisen, ob der Austausch der basischen Aminosäure durch eine neutrale, aromatische Aminosäure Auswirkungen auf die Kanalfunktion hat, wurden Untersuchungen im Oozytenexpressionssystem durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es zu Veränderungen im Schaltverhalten des Kanals kommt. Die Mutation R883W aktiviert erst bei positiveren Spannungen; ferner ist die starke Inaktivierung bei positiver Spannung, die für hERG charakteristisch ist, im Spannungsverlauf nicht zu erkennen. Nur an Hand des

transienten Stroms der nach einem Spannungssprung von einem positiven zu einem negativen Potential wechselt, wird deutlich, dass auch die Mutante die typische Inaktivierung aufweist. Sie ist jedoch weniger stark ausgeprägt als im Wildtyp-Kanal.

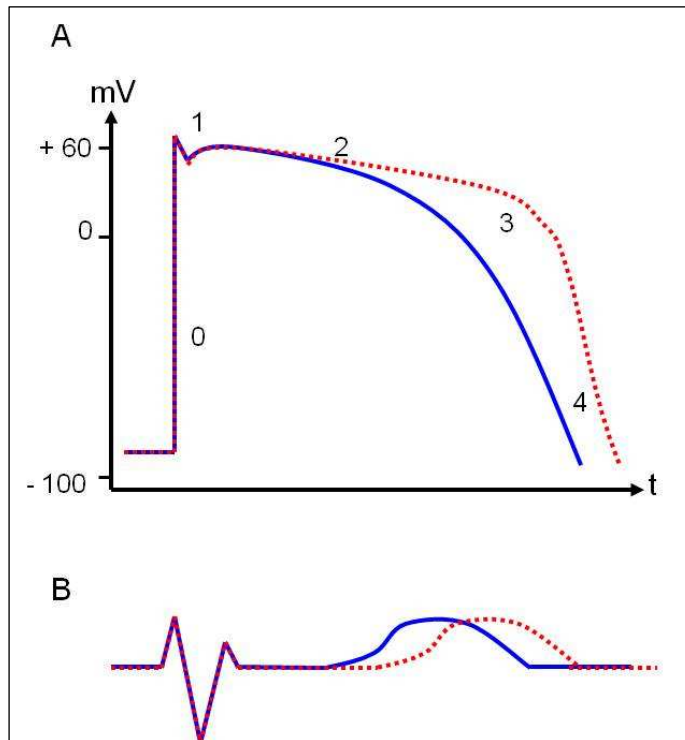
Der hERG Kanal spielt eine wichtige Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotenzials. Charakteristisch dafür ist seine ungewöhnliche Kinetik. Von dem geschlossenen Konformationszustand geht er langsam in den offenen Zustand über, um dann sehr schnell zu inaktivieren. Während der Inaktivierung ist der Kanal nicht weiter erregbar, jedoch erholt er sich bei negativer Spannung wieder schnell von der Inaktivierung. Um in die geschlossene Konformation zu gelangen, muss er über den offenen Zustand gehen, was sehr langsam geschieht (Abb. 4.10). Dies ist der entscheidende Schritt des hERG-Kanals (Herzberg et al, 1998). Durch diese langsame Deaktivierung sind die Kanäle relativ lange geöffnet, so dass es zu einer starken Repolarisation kommt. Im kardialen Aktionspotenzial kann man dies in Phase 3 sehen. Hierbei wird die Plateauphase (Phase 2) beendet, und die Membran wird repolarisiert (Abb. 1.2).



**Abb. 4.10.: Spannungsabhängige Konformation der hERG Kanals.** C= geschlossen, O= offen, i= inaktiviert. Die Pfeile zeigen, dass der geschlossene Kanal über den offenen Zustand inaktiviert. Um von dem inaktivierten Zustand in die geschlossene Konformation zu gelangen, muss erneut der offene Zustand passiert werden.

Durch die Mutation R883W kommt es zu einem stark veränderten Schaltverhalten des hERG Kanals. Während der Wildtyp-Kanal schon bei ca. 0 mV sein Maximum erreicht hat, wird die Mutante erst bei positiveren Spannungen als der Wildtyp-Kanal aktiviert und bleibt aktiv. Durch das veränderte Gating verläuft die Repolarisation des kardialen Aktionspotenzials anders. Die verschobene Spannungsabhängigkeit der Mutanten wird wahrscheinlich dazu führen, dass die Repolarisation später einsetzt als beim Wildtyp-Kanal, so dass sich dadurch das Plateau des Aktionspotenzials verlängert. Durch das Fehlen

der Inaktivierung könnte durch die Mutante jedoch die Repolarisation steiler verlaufen. (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11.: Schematische Darstellung des kardialen Aktionspotenzials (A) und des daraus resultierenden EKGs (B).** Dargestellt sind Phasen 0 - 4. Blau: hERG Wildtyp, rot: möglicher Verlauf der hERG Mutation R883W.

Auf diese Weise würde sich das kardiale Aktionspotenzial geringfügig verlängern. Dies würde auch für den Krankheitsverlauf der Patientin sprechen. Jedoch ist das Schaltverhalten des hERG-Kanals sehr komplex, so dass eine genaue Aussage momentan nur spekuliert werden kann. Mit Hilfe von mathematischen Modellen und unter Berücksichtigung aller mitwirkenden Kanäle könnte eine exakte Vorhersage getroffen werden, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen ist.

Die Patientin hat erst im Alter von 47 Jahren Synkopen bekommen und nicht bereits in früheren Jahren, wie es bei Patienten mit extrem verlängerter QT Zeit der Fall ist. Dennoch sind auch Patienten mit leicht verlängerter QT Zeit Risikopatienten, da auch in diesen Fällen Synkopen und Kammerflimmern zu jeder Zeit eintreten können. Da bei dieser Patientin aus völliger Gesundheit Kammerflimmern auftrat, und die Auswirkungen lebensbedrohlich waren, wurde ihr direkt ein ICD implantiert. Aus diesem Grund war nach Aufklärung der Auswirkungen der R883W Mutation auf den hERG Kanal ein klinischer Nachtest

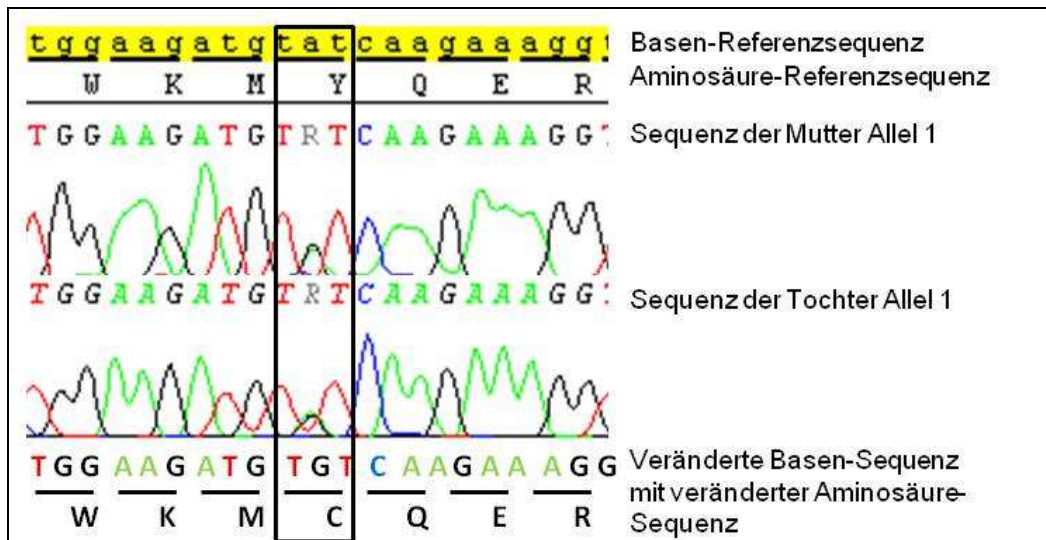
zur Bestätigung des LQTS nicht mehr möglich. Dennoch sprechen die elektrophysiologischen Messungen im Oozytenexpressionsystem dafür, dass die Mutation die Kanalfunktion beeinflusst und somit die Herztätigkeit davon betroffen ist.

#### 4.2.1.4 Mutationen im *RyR2* Gen

##### 4.2.1.4.1 *RyR2* Mutation Y4944C

Bei dieser Patientin handelt es sich um die gleiche Patientin wie im vorangegangenen Fall. Neben den LQTS relevanten Genen wurde auch das mit CPVT assoziierte Gen *RyR2* untersucht. Hierbei konnte eine neue Mutation (Y4944C) nachgewiesen werden. Im C-Terminus des Proteins kommt es zu einem Austausch der aromatischen Aminosäure Tyrosin durch die nicht-aromatischen Aminosäure Cystein. Cystein mit seinem Schwefelatom spielt in der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen eine große Rolle, da es zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommen kann und damit die räumliche Struktur eines Proteins festgelegt wird. Es ist zu spekulieren, dass die Mutation Y4944C Auswirkungen auf die Struktur des Ryanodin Rezeptors haben könnte. Jedoch sind die Möglichkeiten stark eingegrenzt, Struktur- und Funktionsanalysen am Ryanodin Rezeptor durchzuführen. Es handelt sich hierbei um ein sehr großes Protein (> 800kb), das mit vielen Reaktionspartnern (z.B.: Calmodulin und Proteinkinase A) interagiert, um einen funktionsfähigen Komplex zu bilden (Zucchi & Ronca-Testoni, 1997).

Da die Patientin aus völliger Gesundheit ins Kammerflimmern geriet und reanimiert werden musste und bei der genetischen Untersuchung Mutationen in den *KCNH2* und *RyR2* Genen gefunden wurden, wurde ihre Tochter ebenfalls einem genetischen Screening zur Risikoeinschätzung unterzogen. Es wurden beide Gene untersucht, die bei der Mutter mutiert waren: die *KCNH2* Mutation R883W und die *RyR2* Mutation Y4944C. Während das *KCNH2* Gen unauffällig war, konnte bei ihr die *RyR2* Mutation Y4944C nachgewiesen werden (Abb. 4.12).



**Abb. 4.12.:** Ausschnitt aus dem Elektropherogramm des Exon 105 des *RyR2* Gens. Die Referenzsequenz ist gelb unterlegt, darunter befinden sich die Aminosäure-Sequenz sowie die Sequenz der Mutter und die Sequenz der Tochter.

Parallel wurde die Tochter kardiologisch untersucht, wobei man weder strukturelle, noch primär elektrische Auffälligkeiten feststellen konnte. Aus diesem Grund kann man davon ausgehen, dass die *RyR2* Mutation keine Auswirkungen auf die Herzrhythmusfunktion hat und dass bei der Patientin (Mutter) allein die *KCNH2* Mutation zu dem Krankheitsbild geführt hat.

#### 4.2.1.4.2 *RyR2* Mutation V4299M

Eine 19-jährige Frau erlitt seit ihrer Pubertät mehrfach Synkopen. Diese traten meist bei körperlicher Belastung wie z.B. beim Schwimmen oder Rennen auf. Morphologisch wurden am Herzen keine Veränderungen festgestellt, jedoch zeigte das EKG eine deutlich verlängerte QT-Zeit. Das genetische Screening der LQTS relevanten Gene ergab jedoch keinen Hinweis auf eine genetische Veränderung und die Patientin wurde zunächst als „Genotyp-negativ“ LQTS Patientin benannt. In einem weiteren Untersuchungsschritt wurde das *RyR2* Gen analysiert, und hierbei konnte eine neue Mutation (V4299M) nachgewiesen werden. Es kommt zu einem Austausch der aliphatischen Aminosäure Valin

durch Methionin. Diese Mutation befindet sich in einer der drei Divergenz-Regionen des Ryanodinrezeptors.

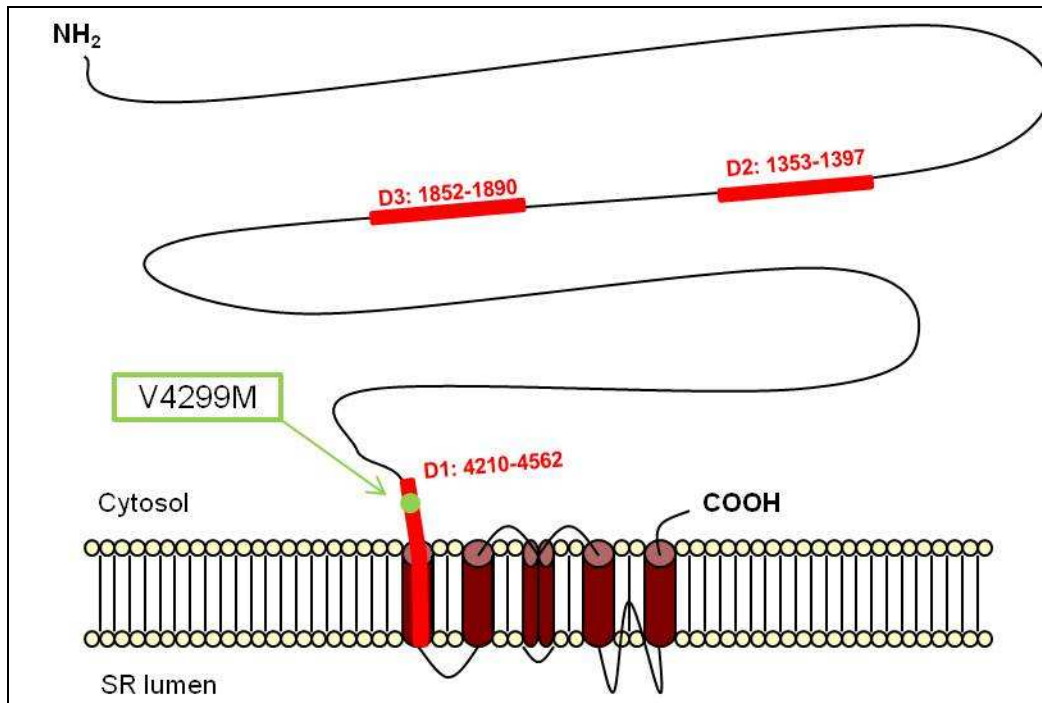
Der Ryanodin Rezeptor kommt in drei Isoformen vor: RyR1 (Skelettmuskel), RyR2 (Herzmuskel und Gehirn) und RyR3 (Zwerchfell). Diese drei Isoformen sind zu 65 % identisch, aber unterscheiden sich in den drei Divergenz-Regionen (Hamilton & Serysheva, 2009). Die Divergenz-Regionen befinden sich für RyR2 an den folgenden Aminosäure-Positionen: D1: 4210 – 4562, D2: 1353 – 1397 und D3: 1852 – 1890 (Abb. 4.13).

Diese Divergenz-Regionen scheinen somit für die gewebespezifische Funktion der Ryanodin Rezeptoren verantwortlich zu sein. Eine weitere Studie ergab erste Hinweise, dass bei Deletion von Teilen der D1 Region ( $\Delta 4187-4381$ ), die  $\text{Ca}^{2+}$  Empfindlichkeit gesteigert ist, jedoch die Inaktivierung bei erhöhtem  $\text{Ca}^{2+}$  geschwächt ist (Du et al, 2000). Somit ist anzunehmen, dass bei Veränderungen in dieser Region die  $\text{Ca}^{2+}$  Freisetzung gestört ist, was wiederum Auswirkungen auf Phase 2 des kardialen Aktionspotenzials hat, da hierbei das Gleichgewicht zwischen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom und  $\text{K}^+$  Ausstrom wichtig für eine lange Plateauphase ist und dies wiederum ein wichtiges Kriterium für die Muskelkontraktion des Herzens ist. Würde die Mutation V4299M zu einer geschwächten Inaktivierung des RyR2 führen, so würde die Plateauphase länger andauern und sich somit die QT-Zeit im EKG verlängern. Das Resultat wäre ein LQTS. Zur näheren Untersuchung müssten Struktur- und Funktionsanalysen des Ryanodin Rezeptor in der Zellkultur an humanen Myocyten durchgeführt werden. Diese Untersuchungen waren im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich.

In der Literatur ist beschrieben, dass in ca. 30 % der „Genotyp-negativen“ LQTS-Fälle keine Mutationen in den LQTS relevanten Genen zu finden sind (Tester & Ackerman, 2008). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass bei einem Drittel der „Genotyp-negativen“ LQTS Patienten Mutationen im *RyR2* Gen gefunden werden konnte (Medeiros-Domingo et al, 2009). Studien wie diese oder auch die neu gefundene Mutation V4299M können helfen die Lücke zwischen symptomatischen, aber LQTS genotypisch negativen Patienten zu schließen. Gerade in Hinblick auf die Vererbung solch schwerwiegender Krankheiten, ist es wichtig Familienmitglieder rechtzeitig genetisch zu untersuchen und eine Risikoeinschätzung vorzunehmen. Mutationsträger können somit rechtzeitig



kardiologisch überwacht und gegebenenfalls frühzeitig behandelt werden, wodurch sich das Risiko eines plötzlichen Herztodes vermindern würde.



**Abb. 4.13.: Schematische Darstellung des Ryanodin Rezeptors.** Die drei Divergenz-Regionen (D1-D3) sind rot dargestellt, die Mutation V4299M befindet sich in D1. SR= Sarkoplasmatisches Retikulum.

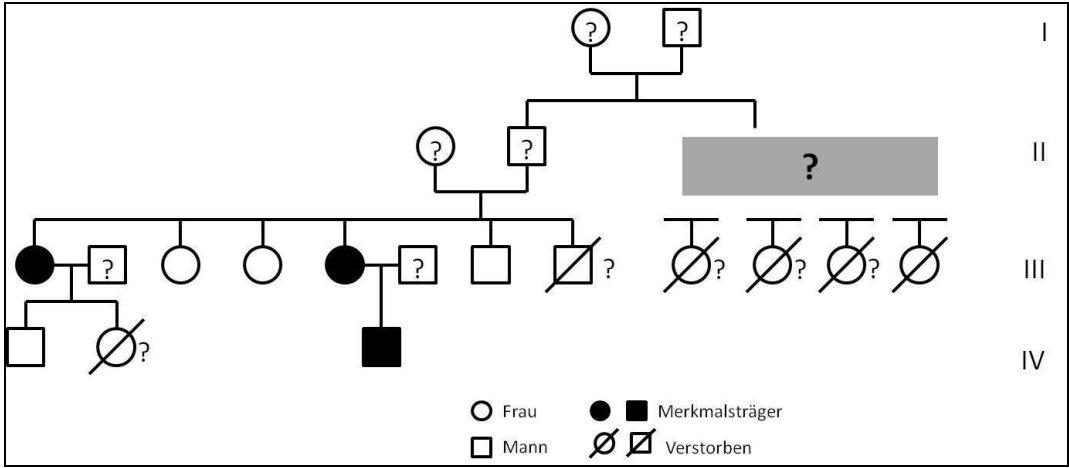
#### 4.2.1.4.3 RyR2 Mutation R420Q

Eine 48-jährige Frau wurde aufgrund von mehrfach aufgetretenen Synkopen kardiologisch untersucht. Hierbei konnten keine Auffälligkeiten diagnostiziert werden. Da im Hinblick auf den plötzlichen Herztod die Familienanamnese (hohe Sterblichkeit bei Familienangehörigen unter 40 Jahren) der Patientin sehr auffällig war, wurde ein genetisches Screening durchgeführt. In den LQTS relevanten Genen konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Daraufhin wurde das Gen des Ryanodin Rezeptors untersucht. Hier konnte die Mutation (R420Q) nachgewiesen werden. Diese Mutation befindet sich im N-Terminus des Proteins und führt zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin durch

die neutrale Aminosäure Glutamin. Bei früheren Untersuchungen von Patienten mit CPVT, bei denen das gesamte *RyR2* Gen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass sich Mutationen in so genannten „Hot-Spot“ Regionen befinden. Es gibt vier „Hot-Spot“ Domänen im *RyR2* Gen, die innerhalb verschiedener Arten und innerhalb der RyR Isoformen hoch konserviert sind und die bei Veränderungen zu Funktionsänderungen des Proteins führen. Diese „Hot-Spot“ Domänen werden in folgende Domänen unterteilt: Domäne I (N-terminal, Aminosäure 77-466), Domäne II (Zentrale Domäne, Aminosäure 2246-2534), Domäne III (Kanalregion, Aminosäure 3778-4201) und Domäne IV (Aminosäure 4497-4959) (George et al, 2007). Die Mutation R420Q befindet sich in Domäne I der „Hot-Spot“ Regionen. Es wird angenommen, dass Domäne I und II innerhalb des RyR2 Proteins interagieren und das Schließen des Kanals regulieren. Treten innerhalb dieser beiden Domänen Mutationen auf, so können sie den geschlossenen Zustand destabilisieren und somit die  $\text{Ca}^{2+}$  Empfindlichkeit verstärken, wodurch es zum unkontrollierten  $\text{Ca}^{2+}$  Ausstoß kommen kann (Wang et al, 2011).

Da die Patientin durch die immer auftretenden Synkopen stark beeinträchtigt ist und das Risiko eines plötzlichen Herztodes sehr hoch ist, wurde ihr eine Defibrillator implantiert. Um weitere mögliche Merkmalsträger in der Familie zu identifizieren und um diese vor einem plötzlichen Herztod zu schützen, wurden die übrigen Familienmitglieder kardiologisch und genetisch untersucht. Hierbei konnte eine Schwester der Patientin, die bereits an Synkopen leidet, sowie deren Sohn als Mutationsträger identifiziert werden (Abb. 4.14).

Von einer verstorbenen Cousine der Patientin konnte noch asserviertes Blut untersucht werden. Diese Cousine war nicht Trägerin der R420Q Mutation. Von den drei anderen Cousins sowie vom verstorbenen Bruder war kein Blut mehr vorhanden, so dass die Frage offen bleibt, ob sie Merkmalsträger waren. Ebenso bei der verstorbenen Tochter der Patientin. Handelt es sich um gerichtliche Leichenöffnungen, so sind die rechtsmedizinischen Institute nur zwei Jahre nach der Obduktion verpflichtet, Untersuchungsmaterial zu asservieren. Da die Personen einige Jahre zuvor verstorben waren, war kein Untersuchungsmaterial mehr vorhanden.



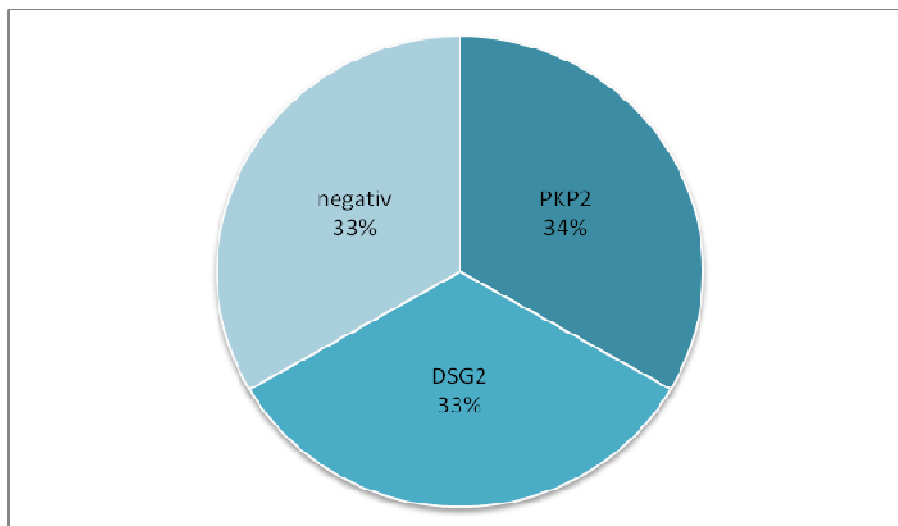
**Abb. 4.14.: Stammbaum der Familie, die die R420Q Mutation im *RyR2* Gen trägt.** Dargestellt sind die Generationen I bis IV. Die mit Fragezeichen markierten Familienmitglieder sind entweder bereits verstorben oder wurden nicht untersucht. Das graue Feld ist mit einem Fragezeichen ebenfalls markiert. Hier sind die genauen verwandtschaftlichen Verhältnisse zwischen den verstorbenen Cousins und der Patientin nicht bekannt.

Im Fall der Schwester und des Neffen der Patientin wurde eine genetische Beratung angeboten. Ebenfalls ist es wichtig, dass beide weiterhin kardiologisch untersucht werden. Da die Schwester bereits unter Synkopen leidet, wurde ihr ein Defibrillator implantiert. Bei deren 6-jährigem Sohn gestaltet sich dies schwieriger, da sich dieser noch im Wachstum befindet und ein ICD in einem Intervall von ca. zehn Jahren ausgetauscht werden muss. Zurzeit wird er medikamentös mit Beta-Blockern behandelt. Es gibt noch keine Studien zur Implantation von ICDs bei Kindern. Aus diesem Grund wurde eine retrospektive Untersuchung von Kindern und Jugendlichen mit ICD von Gradaus durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich diese Behandlung bei Kindern mit überlebtem plötzlichem Herztod oder mit erhöhtem Risiko für einen plötzlichen Herztod als deutlichen Überlebensvorteil erweist und auch zu empfehlen ist (Gradaus, 2003).

#### 4.2.2 Patienten mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie

Auch bei der strukturellen Herzerkrankung „arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie“ kann eine genetische Untersuchung hilfreich sein, da sie vor allem im Anfangsstadium nicht immer erkannt wird und auch hier Familienangehörige untersucht und rechtzeitig geschützt werden können.

Aus diesem Grund wurde eine zweite Patientengruppe, die an der strukturellen Herzerkrankung ARVC (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie) leidet, untersucht. Bei diesen Patienten wurden zunächst die beiden am häufigsten betroffenen Gene Plakophilin-2 (*PKP2*) und Desmoglein-2 (*DSG2*) untersucht. In dieser Patientengruppe konnten in 67 % der Fälle (n=16) Mutationen detektiert werden, wobei sich die gefundenen Mutationen auf beide Gene annähernd gleich verteilen (34 % *PKP2*, 33 % *DSG2*). Laut Literatur kann man in 27 % - 43 % der ARVC Fälle Mutationen im *PKP2* Gen finden (Dalal et al, 2006, Gerull et al, 2004), während sich der Wert bei *DSG2* auf 7 % -26 % beläuft (Awad et al, 2006, Pilichou et al, 2006). Da es sich bei den ARVC Patienten um ein relativ kleines Patientenkollektiv handelt, ist es möglich, dass sich bei einem größeren Patientenkollektiv der Wert dem Literaturwert nähert. Bei einem Drittel der untersuchten Patienten war der Befund in diesen zwei Genen negativ (Abb. 4.15). Auch in diesen Fällen besteht die Möglichkeit, dass in weiteren ARVC assoziierten Genen Mutationen gefunden werden können.



**Abb. 4.15.: Patientenkollektiv mit arrhythmogener rechtsventrikulärer Kardiomyopathie.** Bei 33 % der untersuchten Patienten konnten genetische Veränderungen in dem Gen des kardialen Strukturproteins Desmoglein-2 (*DSG2*) nachgewiesen werden. In 34 % der untersuchten Patienten wurden Mutationen im kardialen Strukturprotein Plakophilin-2 (*PKP2*) gefunden.

#### 4.2.2.1 Mutationen im *DSG2* Gen

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Samira Barazi) wurde das Desmoglein-2 (*DSG2*) Gen bei Patienten mit ARVC untersucht. Bei diesen Untersuchungen war es interessant zu erfahren, in welchem Umfang dieses Krankheitsbild mit genetischen Veränderungen der Gene des Desmosoms in Verbindung gebracht werden kann. Desmoglein-2 ist für einen intakten Zell-Zell-Kontakt in den Glanzstreifen im Herzen verantwortlich. Hierbei konnten zwei bereits bekannte Mutationen und drei neue Mutationen gefunden werden.

Bei einer der beiden bekannten Mutationen handelt es sich um die Mutation V55M (durch unterschiedliche Referenzsequenzen wird sie in der Literatur auch als V56M bezeichnet), welche in einer Genotyp-Phänotyp Studie bei ARVC Patienten entdeckt (Syrris et al, 2007) und ein Jahr später von Posch et al. (2008) charakterisiert werden konnte. Valin in Position 55 des Proteins wird durch Methionin ersetzt. Die Aminosäure Valin befindet sich in der hoch konservierten, extrazellulären Cadherin-Domäne 1 (EC1), die für die Heteromerisierung der Desmogleine verantwortlich ist. Beide Aminosäuren sind unpolar, jedoch ist Methionin ein größeres Molekül. In einem 3D Model konnte gezeigt werden, dass das größere Methionin an Position 55 den Abstand zu den gegenüberliegenden Aminosäuren Isoleucin (I69) und Alanin (A70) verringert (Posch et al).

Eine weitere bekannte Mutation, die in dem ARVC Patientenkollektiv gefunden wurde, ist die Mutation T335A. Diese Mutation befindet sich in der konservierten, extrazellulären Cadherin-Domäne 3 (EC3), welche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen besitzt, die an der Konformationsbildung des Desmoglein-2 beteiligt sind. Durch den Austausch der polaren Aminosäure Threonin durch die unpolare Aminosäure Alanin in einer stark konservierten Region kann es durch Abnahme der Polarität zu einer veränderten  $\text{Ca}^{2+}$  Bindung kommen. Dies könnte die Konformation beeinflussen, wodurch die Tertiärstruktur des Desmoglein verändert wäre, und es folglich zu einer Fehlfunktion des Proteins käme (den Haan et al, 2009).

Eine neue Mutation konnte bei einem ARVC Patienten im Propeptid des Proteins nachgewiesen werden. An Position 49 kommt es zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin durch die neutrale Aminosäure Cystein (R49C). Die Aminosäure Arginin ist hoch konserviert und gehört zum Furin-Spalt-Motiv (RXKR). Dieses Motiv ist sowohl bei verschiedenen Tierarten, als auch innerhalb

der verschiedenen *DSG*-Isoformen konserviert. Desmoglein-2 wird post-translational von der Pro-Protein Convertase (PCs) enzymatisch von seinem Propeptid abgetrennt. Erst nach der Abspaltung ist Desmoglein-2 funktionsfertig und aktiv (Awad et al, 2006). Da die Mutation das zweite Arginin in dem Spaltmotiv betrifft, ist es denkbar, dass das Enzym die Schnittstelle nicht erkennt und somit das Propeptid nicht abgespalten wird.

Die zweite neue Mutation, die bei der Untersuchung des *DSG2* Gens gefunden wurde, ist D441V. Sie befindet sich in der extrazellulären Cadherin-Domäne 4 (EC4), die  $\text{Ca}^{2+}$  Bindestellen besitzt und für die Konformationsausbildung verantwortlich ist (Green & Gaudry, 2000). Bei dieser Mutation in Position 441 des Proteins wird die saure und polare Aminosäure Asparaginsäure durch die neutrale und unpolare Aminosäure Valin ausgetauscht. Asparaginsäure in Position 441 ist sowohl innerhalb der Desmoglein-Isoformen, als auch bei verschiedenen Tierarten konserviert. Daraus kann man schließen, dass D441 für die Funktion der Desmogleine eine wichtige Rolle spielt. Im Falle der Mutation kommt es an dieser Position zu einer Neutralisation, wodurch die Calciumbindung gestört sein könnte, und es zu einer fehlerhaften Proteinstruktur kommen kann.

Als letzte neue Mutation im *DSG2*-Gen wurde A738T bei einem ARVC Patienten gefunden. Diese Mutation befindet sich in der intrazellulären Cadherin-Domäne (ICD), welche mit Plakoglobin innerhalb des Desmosoms interagiert (Green & Gaudry, 2000). In Position 738 kommt es zu einem Austausch der unpolaren Aminosäure Alanin zur polaren Aminosäure Threonin. Da Alanin in dieser Position innerhalb verschiedener Arten konserviert ist, aber nicht innerhalb der verschiedenen Desmoglein-Isoformen, kann man davon ausgehen, dass das Alanin für die herzspezifischen Funktionen wichtig ist, da *DSG2* hauptsächlich in Herzen exprimiert wird.

Alle *DSG2* Mutationen konnten bei Patienten mit ARVC gefunden werden. Die bereits bekannten Mutationen sind in der Literatur beschrieben und charakterisiert worden (Syrris et al, 2007, Posch et al, den Haan et al, 2009). Bei den neuen Mutationen wurden 200 gesunde Kontrollpersonen untersucht, wodurch diese Sequenzveränderungen als Polymorphismen ausgeschlossen werden konnten. Um diese Mutationen weiter zu charakterisieren, müssten mit Myozyten in der Zellkultur Versuche durchgeführt werden, die im Rahmen dieser

Doktorarbeit nicht durchzuführen waren. Somit kann über die Auswirkungen nur spekuliert werden.

#### **4.2.2.2 Mutationen im *PKP2* Gen**

Neben dem Desmoglein-2 wurde ein weiteres desmosomales Protein (Plakophilin-2), welches ebenfalls für den Zell-Zell-Kontakt in den Glanzstreifen im Herzen verantwortlich ist, untersucht. Plakophilin-2 (*PKP2*) interagiert innerhalb der Desmosomen direkt mit weiteren desmosomalen Komponenten, wie Plakoglobin, Desmocollin und Desmoglein (Chen et al, 2002). Im Rahmen einer Diplomarbeit (Elisa Fehlberg-Viering) wurden ARVC Patienten genetisch auf Veränderungen im *PKP2* Gen untersucht, und zwei bekannte Mutationen (M1V und Q726X) konnten gefunden werden. Im Rahmen dieser Dissertation war es möglich, bei nachfolgenden Untersuchungen weiterer Patienten vier neue Mutationen nachzuweisen.

Bei der ersten bekannten Mutation handelt es sich um eine Veränderung des Start-Codons. ATG, welches die Aminosäure Methionin codiert, ist zu GTG mutiert. GTG codiert die Aminosäure Valin. Da das Start-Codon als Translationssignal fungiert, ist anzunehmen, dass es im Fall der M1V Mutation zu keiner Translation des mutierten Proteins kommt. Da der Patient heterozygot erkrankt ist, sind nur 50 % der funktionsfähigen Proteine vorhanden. Dies bedeutet, dass theoretisch 50 % weniger Plakophilin-2 Proteine in die Desmosome eingebaut werden, wodurch der Zell-Zell-Kontakt entsprechend geschwächt ist.

Die zweite bekannte Mutation Q726X führt zu einem verkürzten Protein. Das Triplet CAG, welches die Aminosäure Glutamin codiert, ist zu TAG mutiert. TAG ist ein Stopp-Signal für die Translation und beendet an dieser Stelle die Proteinsynthese. Gerull et al. (2004) konnte diese Mutation in einem ARVC Patienten nachweisen. Die Analyse von 250 gesunden Kontrollpersonen verlief negativ, woraufhin diese Mutation mit dem Krankheitsbild korreliert wurde (Gerull et al, 2004). Glutamin an Position 726 befindet sich im Armadillo-Motiv 8 des Proteins. Die Armadillo-Motive des Plakophilin-2 sind neben der Kopf-Domäne

für die Interaktion mit den desmosomalen Proteinen entscheidend. Betrachtet man Abbildung 1.15 so sieht man, dass Plakophilin ein Bindeprotein innerhalb des Desmosoms ist. Es verbindet Plakoglobin mit Desmoglein und Desmocollin. Durch die Mutation Q726X entsteht ein verkürztes Protein, welches entweder im Desmosom eingebaut wird und seinen Interaktionspartner nicht mehr binden kann, oder das verkürzte Plakophilin-2 wird in der Zelle als fehlerhaft erkannt und abgebaut. In beiden Fällen wäre eine Schwächung des Desmosoms die Folge.

Bei zwei neuen Mutationen kommt es ebenfalls mutationsbedingt zu einem vorzeitigen Stopp-Signal. Die Mutation W123X befindet sich in der Kopfdomäne. Der Einbau des Stopp-Signals lässt die Proteinbiosynthese schon nach 123 Aminosäuren abbrechen. Somit hat dies ein extrem verkürztes Protein zur Folge, wobei fraglich ist, ob es schon nach der Synthese in der Zelle abgebaut, oder doch noch in den Desmosomen eingebaut wird und hier seinen Bindungspartner nicht erreicht. Jedoch könnte es seine Funktion nicht ausüben, da selbst die Kopfdomäne nicht vollständig synthetisiert würde. Wie man in Abb. 4.16 sehen kann, handelt es sich um einen konservierten Bereich, der auf eine wichtige Funktion schließen lässt.

PKP2_homo	GGCACAACTGCCACTTATGAAGGTCGCTGGGGA
PKP2_canis	GGCACCACTGCCACTTATGAAAGCCGCTGGGGG
PKP2_gallus	GCATCACCATCTTCTTATACAAACGGATGGGGG

**Abb. 4.16: Vergleich der Teilsequenz der Kopfdomäne des *PKP2* Gens zwischen Mensch (Homo), Hund (Canis) und Huhn (Gallus).** Das Triplet TGG (rot) codiert die Aminosäure Tryptophan (W).

Das mutierte Plakophilin-2 könnte weder die desmosomalen Proteine an der Kopfdomäne binden, noch könnte es an den Armadillo-Motiven das Plakoglobin binden, da die ARM-Motive nicht synthetisiert würden. Auch dieser Patient hat einen heterozygoten Erbgang, wodurch nur die Hälfte der Plakophilin-Proteine funktionsfähig wäre. Jedoch würde dies nicht ausreichen, ein einwandfreies Desmosom zu bilden, was das Krankheitsbild der ARVC erklären würde.

Ein weiterer Proteinsynthese-Abbruch hat Mutation E380X zur Folge. Auch in diesem Fall resultiert ein Stopp-Signal aus der Mutation. Das Triplet, welches die Aminosäure Glutamin an Position 380 im Protein codiert, wird durch TAG ersetzt.



Dieser Abbruch findet in dem ersten Armadillo-Motiv statt, welches konserviert ist und folglich für die Funktionalität des Plakophilin wichtig zu sein scheint (Abb. 4.17). Wie bereits beschrieben sind die Armadillo-Motive an der Interaktion der desmosomalen Proteine verantwortlich und sorgen dadurch für einen festen Zusammenhalt des Desmosoms.

PKP2_homo	ACTTTCATACAGCACGAGTGCTTCCAGAAATCTG
PKP2_canis	ACTTTCATACAGCACGAGTGCTTCCAGAAATCTG
PKP2_gallus	ACTTTCATACAGCACGAATGCTTCCAGAAAGCAG

**Abb. 4.17: Vergleich der Teilsequenz des ARM1-Motivs des *PKP2* Gens zwischen Mensch (Homo), Hund (Canis) und Huhn (Gallus)** Das Triplett TGG (rot) codiert die Aminosäure Tryptophan (W).

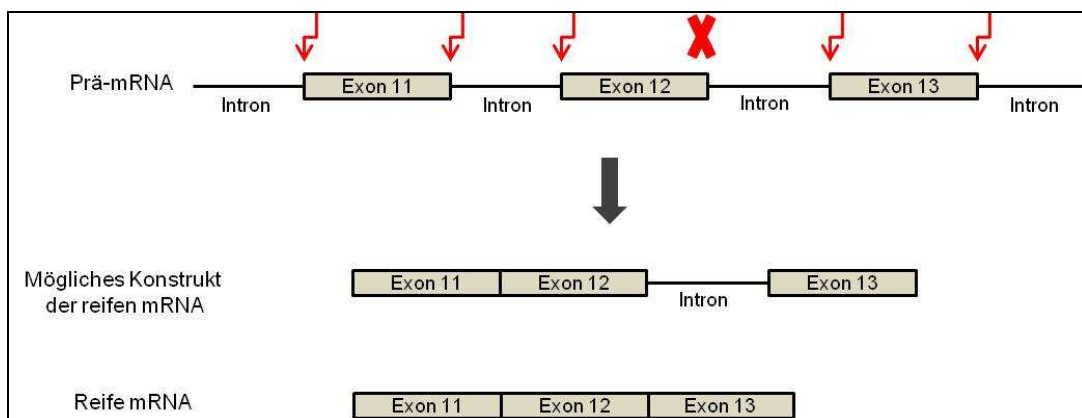
Auch in diesem Fall handelt es sich um eine heterozygote Mutation, wodurch der Patient nur 50% funktionsfähige Plakophilin Proteine ausbilden würde, was eine Schwächung des Desmosoms zur Folge hätte.

Ebenfalls im Armadillo-Motiv 1 befindet sich die neue Mutation R388W. Die stark basische Aminosäure Arginin an Position 388 wird durch die neutrale Aminosäure Tryptophan ersetzt. Ein Kennzeichen der Armadillo-Motive ist, dass sie positiv geladene Furchen bilden, die mit den desmosomalen Cadherinen interagieren (Huber et al, 1997). Dadurch, dass Arginin in Position 388 konserviert ist, ist es denkbar, dass die Neutralisation des Arginins die Bindung an die desmosomalen Cadherine beeinflusst, und es somit zu einer gestörten Interaktion innerhalb des Desmosoms kommt. Auch diese Mutation hätte demnach einen verminderten Zell-Zell-Kontakt innerhalb des Myozytenverbandes zur Folge.

PKP2_homo	AAGCTCGGAAGAGGGT
PKP2_canis	AAGCACGGAAAAGGGT
PKP2_gallus	AAGCCAGAAGAAAAGT

**Abb. 4.18: Vergleich der Teilsequenz des ARM1-Motivs des *PKP2* Gens zwischen Mensch (Homo), Hund (Canis) und Huhn (Gallus).** Auch wenn die Basenabfolge im Triplett (rot) nicht identisch ist, codieren doch alle Triplets die Aminosäure Arginin.

Als letzte neue Mutation im *PKP2* Gen konnte eine Veränderung des Splice-Motivs (GT) gefunden werden. Hierbei kommt es zu einer heterozygoten Mutation der Base Guanin (G) zu Adenin (A). Betrachtet man die genomische DNA des *PKP2* Gens, kann man vor und nach jedem Exon sich wiederholende Motive erkennen. Vor den *PKP2* Exons findet man in der Regel das Motiv CA, während nach jedem Exon das Motiv GT zu finden ist. Diese Erkennungsstellen sind für die Splicing-Enzyme (snRNAs) von großer Bedeutung, da diese Bereiche erkannt und geschnitten werden, bevor sie den Zellkern verlassen und zur Translation freigegeben werden. Durch alternatives Splicing entstehen die verschiedenen Isoformen der Proteine und sind für die große Vielfalt verantwortlich. Kommt es nun in solch einem Erkennungsmotiv zu Veränderungen, ist es möglich, dass das Enzym die Schnittstelle nicht mehr erkennt, wodurch das nachfolgende Intron nicht mehr vom vorangegangenen Exon getrennt wird (Abb. 4.19). Somit ist es denkbar, dass das nicht-codierende Intron in die mRNA eingebaut wird und in der Zelle als fehlerhaftes Konstrukt erkannt und direkt abgebaut wird. In welchem Umfang ein nicht herausgeschnittenes Intron Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.



**Abb. 4.19: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der *PKP2* Gens.** Auf DNA Ebene sind die codierenden Exons von nicht codierenden Introns getrennt, die während der Transkription in die prä-mRNA übersetzt werden. Um die reife mRNA zu erhalten, müssen die Introns durch Splice-Enzyme (rote Pfeile) herausgeschnitten werden. Man erhält eine reife mRNA, bei der alle Exons nahtlos aneinander gereiht sind. Schneidet ein Enzym nicht an der Splicing-Erkennungsstelle (rotes X), kann das Intron nicht abgespalten werden und könnte entweder in die reife mRNA eingebaut, oder aber bereits in einem früheren Stadium als fehlerhaft erkannt und abgebaut werden, so dass keine mRNA entstehen würde.

#### 4.3 Untersuchung von Personen mit ungeklärter Todesursache

Es wurden 21 Blutproben von plötzlich Verstorbenen molekulargenetisch auf Mutationen in den Genen *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *RyR2*, *PKP2*, *DSG2* untersucht. In allen 21 Fällen konnte die Todesursache durch eine Obduktion sowie histologische und toxikologische Untersuchungen nicht geklärt werden. Somit handelte es sich um ungeklärte Todesfälle mit Verdacht auf einen plötzlichen Herztod. Bei der Untersuchung von Proben von zwei Verstorbenen konnte je eine Mutation nachgewiesen werden. In der Literatur ist beschrieben, dass bei ungeklärten Todesfällen die Todesursache in 10 % - 35 % der Fälle auf genetisch bedingte primär elektrische Herzerkrankungen zurückzuführen ist (Tester & Ackerman, 2006, Ingles & Semsarian, 2007). Trotz der geringen Probenzahl konnte der Literaturwert bestätigt werden. In 10 % der untersuchten Fälle ist die Todesursache auf genetisch bedingte primär elektrische Herzerkrankungen zurückzuführen (Abb.4.20).

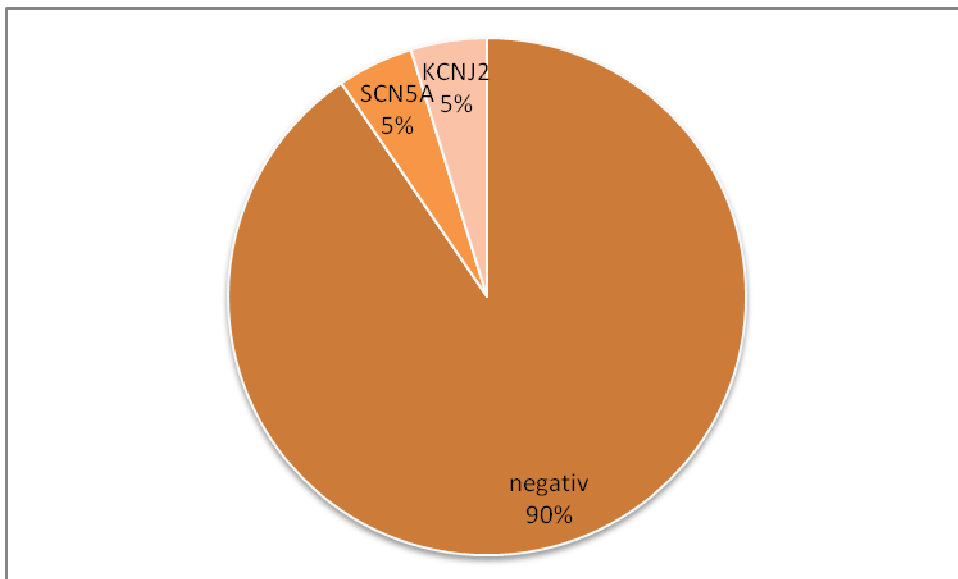


Abb. 4.20: Verteilung des genetischen Screenings in ungeklärten Todesfällen (n=21)

#### 4.3.1 *SCN5A* Mutation I1768V

Im Rahmen eines Zahnarztbesuches kollabierte eine 33-jährige Frau. Sie wurde reanimiert, verstarb jedoch kurze Zeit darauf. Während der Obduktion konnte die Todesursache nicht geklärt werden. Negativ verliefen ebenfalls die toxikologischen und histologischen Untersuchungen. Die molekulare Autopsie der LQTS und CPVT relevanten Gene ergab, dass im *SCN5A* Gen, welches den spannungsabhängigen Natriumkanal am Herzen codiert, ein Polymorphismus (H558R) und eine Mutation (I1768V) nachgewiesen werden konnten.

Der Polymorphismus H558R befindet sich im DI-DII-Linker des Natriumkanals und kommt mit einer Häufigkeit von 20% in der gesunden Bevölkerung vor. Studien belegen, dass der Polymorphismus alleine keinen Einfluss auf die Funktionalität des Kanals hat, jedoch in Verbindung mit weiteren Mutationen regulatorisch wirken kann (Viswanathan et al, 2003). Bei der verstorbenen Frau konnte neben dem Polymorphismus eine Mutation gefunden werden. Diese Mutation I1768V ist bereits in der Literatur beschrieben und wurde mit dem LQT3 Syndrom in Verbindung gebracht (Rivolta et al, 2002). Sie befindet sich im Transmembransegment S6 der Domäne IV des kardialen Natriumkanals. Hierbei kommt es zu einem Austausch der neutralen und aliphatischen Aminosäure Isoleucin durch die ebenfalls neutrale und aliphatische Aminosäure Valin. Valin besitzt zwei Methylgruppen und gehört zu den kleinen Aminosäuren. Bei Isoleucin an Position 1768 handelt es sich um eine hoch konservierte Aminosäure (Abb. 4.21).

<i>SCN5A_homo_Ex28</i>	GTCAACATGTACATTGCCATCATCCTGGAGAACTTCAGCGTG
<i>SCN5A_canis</i>	GTCAACATGTACATCGCCATCATCCTCGAGAACTTCAGCGTG
<i>SCN5A_mus</i>	GTCAACATGTACATTGCCATCATCCTGGAGAACTTCAGTGTG

**Abb. 4.21: Vergleich eines Teils des Exon 28 des *SCN5A* Gens zwischen Mensch (Homo), Maus (Mus) und Hund (Canis).** Auch wenn die Basenabfolge im Triplett (rot) nicht identisch ist, codieren doch alle drei Triplets die Aminosäure Isoleucin.

Vergleicht man die Aminosäure Isoleucin an Position 1768 innerhalb der verschiedenen Isoformen der humanen Natriumkanäle, kann man erkennen, dass auch bei diesem Vergleich Isoleucin konserviert ist (Abb. 4.22). Dies lässt

auf eine wichtige funktionelle Rolle innerhalb der verschiedenen Natriumkanal-Isoformen schließen.

SCN1A	CTGGTTGTGGTGAACATGTACATCGCGGTCAT
SCN3A	CTGGTTGTGGTGAACATGTACATCGCGGTCAT
SCN4A	CTCATCGTGGTCAACATGTACATCGCCATCAT
SCN7A	CTGATCATTGTAAATATGTACATTGTTGTTGT
SCN5A_homo_Ex28	CTCATCGTGGTCAACATGTACATTGCCATCAT

**Abb. 4.22: Vergleich eines Teils des Exon 28 des kardialen SCN5A Gens mit den verschiedenen humanen Natriumkanal-Genen.** SCN1A und SCN3A sind neuronale Formen, SCN4A wird im Skelettmuskel und SCN7A im Uterus exprimiert. Auch wenn die Basenabfolge im Triplet (rot) nicht identisch ist, codieren doch alle drei Triplets die Aminosäure Isoleucin.

Die Mutation I1768V wurde bereits bei Patienten mit LQT3 Syndrom beschrieben aber noch nicht in Fällen von plötzlichem Herztod (Groenewegen et al, 2003, Rivolta et al, 2002). In welchem Umfang der Polymorphismus regulatorisch auf die Mutation wirkt, sollten elektrophysiologische Untersuchungen in Oozytenexpressionssystem zeigen. Da Polymorphismus und Mutation in zu großer Entfernung auf der DNA liegen, konnte nicht geklärt werden, ob beide Veränderungen auf einem Allel liegen oder auf zwei Allele verteilt sind. Zunächst wurde ein Konstrukt hergestellt, das beide Sequenzveränderungen auf einem Allel besitzt. Dieses wurde in verschiedenen Konzentrationen in *Xenopus* Oozyten injiziert und ein bis vier Tage inkubiert. Es konnten keine Natriumströme gemessen werden. Da der Wildtyp Kanal sehr gut exprimiert wurde, konnte ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden. Um zu klären, ob der Kanal in den Oozyten nicht exprimiert oder nur nicht in der Membran eingebaut wird, wurden Westernblot-Versuche mit Na<sub>v</sub>1.5 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierbei zeigte es sich, dass der Kanal nicht exprimiert wird. Es konnten keine Na<sub>v</sub>1.5 Proteine in dem Zelllysate nachgewiesen werden. Es kann spekuliert werden, dass beide Sequenzvarianten, sofern sie bei der verstorbenen Frau auf einem Allel vorkamen, Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins nehmen und es durch Konformationsänderungen zum Abbau des fehlerhaften Kanals innerhalb der Zelle kommt. H558R hat einen Austausch der schwach basischen Aminosäure Histidin zur basischen Aminosäure Arginin zur Folge, was bei der Faltung des Proteins ein entscheidender Faktor sein könnte. Bei der Mutation I1768V kommt es zwar nicht zu einer Ladungsänderung beider Aminosäuren, jedoch ist Valin im Vergleich zu Isoleucin eine kleine Aminosäure, und da

Isoleucin an Position 1768 stark konserviert ist, kann man annehmen, dass eine sterische Veränderung an einer so wichtigen Position Auswirkungen auf den Kanal oder die Faltung haben könnte.

In einem zweiten Versuch wurde ein Konstrukt hergestellt, das nur die Mutation trägt und ein zweites, welches nur den Polymorphismus beinhaltet. Beide Konstrukte wurden in *Xenopus* Oozyten sowohl einzeln injiziert als auch co-injiziert. Hierbei konnten Natriumströme bei H558R, I1768V und H558R+I1768V gemessen werden. Im Vergleich zum Wildtypkanal konnte festgestellt werden, dass sowohl die I1768V Mutante als auch die H558R+I1768V Mutante schon bei negativeren Spannungen aktiviert ist. Dies ist für die I1768V Mutante in der Literatur nicht beschrieben und könnte daran liegen, dass in dieser Arbeit bei allen Messungen die Na<sub>v</sub>1.5  $\alpha$ -Untereinheit gemeinsam mit der Na<sub>v</sub>1.5  $\beta$ -Untereinheit exprimiert wurde, was in den anderen Studien nicht durchgeführt wurde. Es ist bekannt, dass die Na<sub>v</sub>1.5  $\beta$ -Untereinheit in vivo Einfluss auf die Kanalfunktion nimmt (Abriel, 2010). Somit sind die Bedingungen, wie sie in dieser Arbeit vorliegen ein wichtiges physiologisches Model. Der Polymorphismus H558R verhält sich bei der Aktivierung gleich dem Wildtyp. Vergleicht man alle Konstrukte mit dem Wildtyp während der Inaktivierungs-Phase, kann man feststellen, dass die Inaktivierung weder von Mutante noch Polymorphismus beeinflusst wird. Anders bei der Recovery-Phase des Natriumkanals. Hier verhalten sich Wildtyp und H558R identisch, während I1768V und I1768V+H558R eine 4-fach verkürzte Recovery-Phase zeigen. Die Recovery-Phase spielt eine wichtige Rolle, da in dieser Zeit die Kanäle nicht erregbar sind und sich erholen können. Gleichzeitig beeinflusst sie die Balance zwischen Depolarisation und Repolarisation und nimmt dadurch direkten Einfluss auf die Dauer des kardialen Aktionspotenzials. Da die co-injizierte Mutante (H558R+I1768V) und die Einzelmutante (I1768V) sowohl bei Aktivierung als auch bei der Recovery das gleiche Verhalten zeigen, kann man annehmen, dass der Polymorphismus die Mutation nicht beeinflusst, sofern beide Sequenzvarianten bei der verstorbenen Frau auf zwei Allelen vorkamen.

Auch wenn unbekannt geblieben ist, auf welchen Allelen die beiden Sequenzvarianten bei der verstorbenen Frau vorkamen, kann man bei beiden Versuchsansätzen die Auswirkungen auf das kardiale Aktionspotenzial und somit auf die Herzfähigkeit rekonstruieren. Durch die schnellere Aktivierung der I1768V Kanäle kommt es zu einem „gain-of-function“ Effekt, zum anderen hat die

Mutante durch die stark verkürzte Recoveryzeit Einfluss auf die Plateau-Phase des kardialen Aktionspotenzials. Kämen beide Sequenzvarianten auf einem Allel vor, kann man spekulieren, dass die Kanäle nicht in der Membran eingebaut werden würden, sondern als fehlerhafte Proteine in der Zelle erkannt und abgebaut würden. Da es sich um einen heterozygoten Erbgang handelt, würden theoretisch 50 % fehlerhafte Kanäle auftreten. Die verbleibenden 50 % der Kanäle wären zwar intakt, wären jedoch zu wenig, was wiederum Einfluss auf das kardiale Aktionspotenzial hätte.

Da die Verstorbene zwei Kinder hinterlässt, wurde dem Ehemann eine genetische Beratung mit gegebenenfalls genetischer Untersuchung und kardiologischer Überwachung der Kinder angeboten.

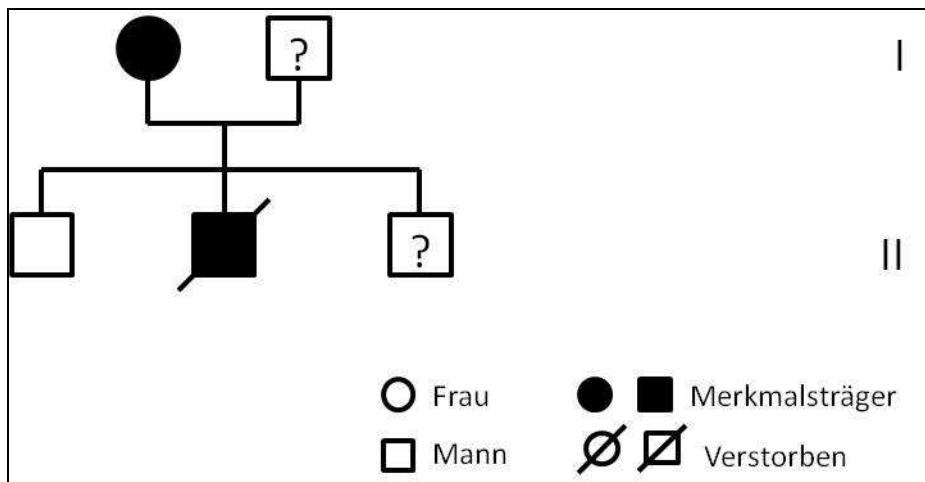
#### 4.3.2 *KCNJ2* Mutation A371G

Ein 19-jähriger Mann verstarb plötzlich in seinem elterlichen Haus. Die Todesursache konnte durch eine Obduktion nicht geklärt werden. Die mikrobiologischen, histologischen und toxikologischen Untersuchungen erbrachten ebenfalls keinen Hinweis. Bei der molekularen Autopsie der LQTS und CPVT relevanten Gene konnte eine neue Mutation (A371G) im *KCNJ2* Gen, welches den einwärts gleichgerichteten Kaliumkanal (Kir2.1) am Herzen codiert, gefunden werden. Diese Mutation befindet sich im C-Terminus des Proteins und führt zu einem Austausch der neutralen und unpolaren Aminosäure Alanin durch die ebenfalls neutrale und unpolare Aminosäure Glycin. Glycin besitzt im Vergleich zu Alanin nur eine H-Gruppe und ist demnach geringfügig kleiner als Alanin mit einer CH<sub>3</sub>-Gruppe.

KCNJ2_homo	AAATATATCCTCTCAAATGCAAATTCATTTTGCTATGAAA
KCNJ2_mus	AAATACATCCTTTCAAATGCAAATTCATTTTGCTATGAAA
KCNJ2_oryctolagus	AAATATATCCTGTCAAACGCTAATTCATTTTGCTATGAAA
KCNJ2_canis	AAATACATCCTCTCAAATGCTAACTCCTTTTGCTACGAAA
KCNJ2_bos	AAATACATCCTGTGGAACGCTAACTCGTTTTGCTACGAAA

**Abb. 4.23:** Vergleich eines Teils der *KCNJ2* Sequenz zwischen Mensch (Homo), Maus (Mus), Kaninchen (*Oryctolagus*), Hund (Canis) und Rind (Bos). Sowohl das Triplet GCA als auch das Triplet GCT (rot) codiert die Aminosäure Alanin.

Bei der Aminosäure Alanin an Position 371 handelt es sich um eine stark konservierte Aminosäure (Abb. 4.23). Es ist davon auszugehen, dass sich im C-Terminus des Kir2.1-Kanals wichtige funktionelle Bereiche befinden. Eine Studie an Meerschweinchen zeigte, dass im Säuger-Herz neben Kir2.1 auch die Isoformen Kir2.2 und Kir2.3 exprimiert werden (Liu et al, 2001). Diese Isoformen sind in der Lage, untereinander funktionsfähige Homo- und Heteromere zu bilden. Bei dieser Homo- und Heteromerisierung spielen der N- und der C-Terminus der Kir2.x Isoformen eine entscheidende Rolle (Preisig-Müller et al, 2002). Mutationsanalysen haben ergeben, dass der N-Terminus direkt mit dem C-Terminus interagiert. Bei dieser Studie wurden Mutationen im N-Terminus des Kir2.1 Kanals, die man bei Patienten nachgewiesen hat, untersucht und man konnte feststellen, dass die Interaktion des mutierten N-Terminus mit dem C-Terminus gestört und als Folge der Ionen-transport reduziert ist (Decher et al, 2007). In dieser Studie wurden jedoch nur Mutationen im N-Terminus untersucht. Dadurch, dass beide Termini miteinander interagieren, ist anzunehmen, dass auch Mutationen im C-Terminus Einfluss auf die Homo- und Heteromerisierung nehmen und ebenfalls zu einem spezifischen Krankheitsbild, in diesem Fall zum LQT7 Syndrom, führen können. Um dies nachzuweisen, sind elektrophysiologische Untersuchungen im Oozytenexpressionssystem sinnvoll.



**Abb. 4.24: Stammbaum der Familie, die die A371G Mutation im *KCNJ2* Gen trägt.** Dargestellt sind die Generationen I und II. Die mit Fragezeichen markierten Familienmitglieder wurden noch nicht untersucht.



Da die Mutter des Verstorbenen unter Herzrhythmusstörungen leidet, wurde sie aufgrund des Befundes ihres verstorbenen Sohnes kardiologisch untersucht. Hierbei wurde eine LQTS-Verdachtsdiagnose gestellt, woraufhin eine genetische Untersuchung durchgeführt wurde. Auch bei ihr konnte die Mutation A371G im *KCNJ2* Gen nachgewiesen werden. Der Bruder des Verstorbenen, der kardiologisch nicht auffällig ist, wurde präventiv genetisch untersucht. Bei ihm konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden, was erste Hinweise liefert, dass diese Mutation phänotypisch mit dem LQT7 Syndrom korreliert werden könnte. Um dies endgültig zu bestätigen, müssen die elektrophysiologischen Untersuchungen zur Charakterisierung der Mutation A371G abgewartet werden.

#### **4.4 Die Bedeutung der molekularen Autopsie**

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die molekulare Autopsie im Institut für Rechtsmedizin (Frankfurt) etabliert und in Fällen von plötzlichem Herztod angewandt. Es wurden Blutproben von Verstorbenen untersucht, die unter 40 Jahre alt waren, und bei denen durch eine Obduktion keine Todesursache ermittelt werden konnte. In zwei Todesfällen war es möglich, genetische Veränderungen in den kardialen Ionenkanalgenen nachzuweisen und als mögliche Todesursache in Verbindung zu bringen. In einem Fall konnte in anschließenden elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Mutation I1768V des *SCN5A* Gens gemeinsam mit dem Polymorphismus H558R die Tätigkeit des Natriumkanals beeinflusst und folglich Auswirkungen auf die Herztätigkeit hat. In einem weiteren Fall wird der Einfluss der Mutation A371G auf den Kaliumkanal Kir2.1 derzeit untersucht. Die molekulare Autopsie stellt somit eine wichtige, forensische Untersuchungsmethode in Fällen von plötzlichem Herztod dar.

Neben der Todesursachenermittlung ist die genetische Untersuchung von Familienangehörigen von den verstorbenen Personen wichtig, da Mutationen vererbt werden und Familienangehörige des Verstorbenen ebenfalls Träger dieser potentiell lebensbedrohlichen Veränderung sein können. In diesem Fall hat diese Untersuchungsmethode die Aufgabe, Angehörige durch geeignete präventive Behandlungsmethoden vor einem plötzlichen Herztod zu schützen.

In Zusammenarbeit mit der Kerckhoff Klinik wurden Patienten molekulargenetisch untersucht, bei denen definierte Herzkrankheiten, wie primär elektrische (Long QT Syndrom, Brugada Syndrom, Katecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie) oder strukturelle Herzerkrankungen (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie) diagnostiziert wurden. Bei einigen Patienten war die klinische Diagnose nicht eindeutig, so dass ein genetisches Screening weiteren Aufschluss geben sollte. In diesen Untersuchungen konnten sowohl einige bekannte als auch neue Mutationen identifiziert werden. Bekannte, wie auch neue Mutationen konnten mit den entsprechenden Krankheitsbildern in Verbindung gebracht werden. Bei unklaren Diagnosen ist die molekulargenetische Untersuchung daher sinnvoll, da bei positivem Befunde der Kardiologe einen Hinweis bekommt, worauf er den Patienten weiter untersuchen muss, um gegebenenfalls ein bestimmtes Krankheitsbild zu diagnostizieren oder auch auszuschließen. Wie bei der molekularen Autopsie ist in diesen Fällen eine molekular-genetische Untersuchung der betroffenen Familien ratsam. Hierbei können kardiologisch bisher unauffällige Familienmitglieder rechtzeitig erkannt und von einem Kardiologen beobachtet werden.

Im Rahmen des Gendiagnostikgesetzes (GenDG) ist vor jeder genetischen Untersuchung eine genetische Beratung notwendig. Hierbei wird die betroffene Person über die Vor- und Nachteile sowie die Auswirkungen eines möglichen positiven Ergebnisses der Untersuchung aufgeklärt. In diesem Zusammenhang wurde eine interdisziplinäre Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin, dem Institut für Humangenetik des Klinikums der Universität Frankfurt und der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim gegründet. Für die rechtsmedizinischen Institute kann diese interdisziplinäre Kooperation als Vorbild dienen.

## 5 Zusammenfassung

In den westlichen Industriestaaten stellt der plötzliche Herztod eine der häufigsten Todesursachen dar. In ca. 10% derartiger Todesfälle trifft es junge und asymptomatische Personen, bei denen der plötzliche Herztod das erste und einzige Anzeichen einer primär elektrischen Herzerkrankung ist. Derartige Erkrankung können durch eine Obduktion nicht nachgewiesen werden, da das Herz autopsisch gesund erscheint. In den letzten Jahren konnten Mutationen in kardialen Ionenkanal-Genen gefunden werden, die mit primär elektrischen Herzerkrankungen in Verbindung gebracht wurden. Somit bekommt die molekulare Autopsie, das genetische Screening der involvierten Gene, einen immer höheren Stellenwert in den rechtsmedizinischen Instituten zur Aufklärung solcher ungeklärter Todesfälle. Diese kardialen Ionenkanalerkrankungen haben in den meisten Fällen einen genetischen Ursprung und können innerhalb einer Familie vererbt werden. Neben der Aufklärung der Todesursache rückt somit auch die Frage der Prävention innerhalb einer Familie mit einer primär elektrischen Herzerkrankung in den Vordergrund. Potentiell gefährdete Familienmitglieder können nach einer eingehenden genetischen Beratung, molekular-genetisch und kardiologisch untersucht werden, und gegebenenfalls kann eine präventive Therapie einleitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung von sieben Genen, die für primär elektrische Herzerkrankungen in Frage kommen, etabliert. Hierzu gehören die kardialen Kaliumkanal-Gene *KCNQ1*, *KCNH2*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2* sowie das Gen des kardialen Natriumkanals *SCN5A* und des Ryanodin Rezeptors *RyR2*. Zwei weitere Gene, die in Verbindung mit der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) gebracht werden, wurden ebenfalls etabliert. Dabei handelt es sich um Gene, die desmosomale Proteine codieren: Desmoglein-2 (*DSG2*) und Plakophilin-2 (*PKP2*).

In Zusammenarbeit mit der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim wurden Patienten, mit zum Teil definierter primär elektrischer Herzerkrankung, auf Veränderungen in kardialen Ionenkanalgenen untersucht. Bei Patienten mit primär elektrischen Herzerkrankungen konnten sowohl neue, als auch bekannte Mutationen gefunden werden:

1. Im *SCN5A* Gen wurden zwei bekannte Mutationen (R1193Q und E1053K) und eine neue Mutation (A1186T) detektiert.
2. Im *KCNH2* Gen wurde eine bekannte Mutation (R1047L), die jedoch in der Literatur auch als Polymorphismus beschrieben wurde, nachgewiesen. Zusätzlich wurden zwei neue Mutationen gefunden (L69P und R883W).
3. Eine bekannte Mutation (R366Q) wurde im *KCNQ1* Gen entdeckt.
4. Drei neue Mutationen (R420Q, V4299M und Y4944C) wurden im *RyR2* Gen gefunden.

Die neuen Mutationen im *SCN5A* und *KCNH2* Gen wurden im Oozytenexpressionssystem auf ihre Auswirkung auf den entsprechenden Ionenkanal untersucht und charakterisiert. Bei diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Mutationen Einfluss auf die Kanalfunktion nehmen und somit auch die Herzfähigkeit beeinflussen können.

Bei der zweiten Patientengruppe, bei der eine arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC) diagnostiziert wurde, wurden Gene für zwei kardiale desmosomale Proteinen untersucht:

1. Im *DSG2* Gen konnten zwei bekannte (V55M und T335A) und drei neue Mutationen (R49C, D441V und A738T) detektiert werden.
2. Im *PKP2* Gen wurden zwei bekannte (M1V und Q726X) und drei neue Mutationen (W123X, E380X und R388W) gefunden. Eine weitere neue Mutation wurde in der Splicing-Erkennungsstelle nach Exon 12 des Gens nachgewiesen.

Bei der genetischen Untersuchung (molekulare Autopsie) von 21 Personen mit ungeklärter Todesursache konnten in zwei Fällen Mutationen in kardialen Ionenkanalgenen detektiert werden.

1. Bei einer 33-jährigen Verstorbenen konnte im *SCN5A* Gen eine bekannte Mutation (I1768V) und ein Polymorphismus (H558R) nachgewiesen werden. I1768V ist bei Patienten mit Long QT Syndrom 3 bereits beschrieben, wurde aber weder in Kombination mit dem Polymorphismus H558R gefunden noch mit plötzlichem Herztod in Verbindung gebracht.
2. Im Todesfall eines 19-jährigen Mannes wurde im *KCNJ2* eine neue Mutation (A371G) nachgewiesen, deren Untersuchung allerdings noch nicht abgeschlossen ist.

Für die Zukunft wäre es sinnvoll, noch weitere kardiale Gene in das genetische Screening aufzunehmen. Es handelt sich dabei um fünf Gene, die in < 1% der Krankheitsfälle Mutationen aufweisen: Ankyrin-B (*ANK2*), das Gen des kardialen Calciumkanals (*CACNA1C*) und der  $\beta$ -Untereinheit des kardialen Natriumkanals (*SCN4B*), Caveolin-3 (*CAV3*),  $\alpha$ 1-Syntrophin (*SNTA1*) und das Ankerprotein der A-Kinase (*AKAP9*).

Gemeinsam mit der Kerckhoff Klinik in Bad Nauheim und mit dem Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Frankfurt war es möglich eine interdisziplinäre Kooperation zu etablieren, die eine optimale Behandlung betroffener Familien garantiert. Dies kann als Vorbild für weitere rechtsmedizinische Institute gelten, da in diesen Instituten derartige Fälle auftreten und weiterführende molekulargenetische Untersuchungen dort angeordnet und bearbeitet werden können.

## 6 Literatur

- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT & Goldstein SA (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**: 175–187
- Abriel H (2010) Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**: 2–11
- Abriel H, Schläpfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R & Kappenberger L (2004) Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss Med Wkly* **134**: 685–694
- Anson BD, Ackerman MJ, Tester DJ, Will ML, Delisle BP, Anderson CL & January CT (2004) Molecular and functional characterization of common polymorphisms in HERG (KCNH2) potassium channels. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**: H2434–41
- Armstrong CM (1981) Sodium channels and gating currents. *Physiol. Rev.* **61**: 644–683
- Armstrong CM & Bezanilla F (1974) Charge movement associated with the opening and closing of the activation gates of the Na channels. *J. Gen. Physiol.* **63**: 533–552
- Armstrong CM & Bezanilla F (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.* **70**: 567–590
- Ashcroft FM (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**: 440–447
- Asimaki A, Syrris P, Wichter T, Matthias P, Saffitz JE & McKenna WJ (2007) A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 964–973
- Awad MM, Dalal D, Cho E, Amat-Alarcon N, James C, Tichnell C, Tucker A, Russell SD, Bluemke DA, Dietz HC, Calkins H & Judge DP (2006) DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **79**: 136–142
- Balser JR, Nuss HB, Chiamvimonvat N, Pérez-García MT, Marban E & Tomaselli GF (1996) External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels. *J. Physiol. (Lond.)* **494 ( Pt 2)**: 431–442
- Bauce B, Nava A, Beffagna G, Basso C, Lorenzon A, Smaniotto G, Bortoli M de, Rigato I, Mazzotti E, Steriotis A, Marra MP, Towbin JA, Thiene G, Danieli

- GA & Rampazzo A (2010) Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Heart Rhythm* **7**: 22–29
- Beery TA, Shah MJ & Benson DW (2009) Genetic characterization of familial CPVT after 30 years. *Biol Res Nurs* **11**: 66–72
- Biggin PC, Roosild T & Choe S (2000) Potassium channel structure: domain by domain. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 456–461
- Bonné S, van Hengel J & van Roy F (2000) Assignment of the plakophilin-2 gene (PKP2) and a plakophilin-2 pseudogene (PKP2P1) to human chromosome bands 12p11 and 12p13, respectively, by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **88**: 286–287
- Brugada J, Brugada R & Brugada P (2007) Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz* **32**: 185–191
- Camacho JA, Hensellek S, Rougier J, Blechschmidt S, Abriel H, Benndorf K & Zimmer T (2006) Modulation of Nav1.5 channel function by an alternatively spliced sequence in the DII/DIII linker region. *J. Biol. Chem.* **281**: 9498–9506
- Chen J, Zou A, Splawski I, Keating MT & Sanguinetti MC (1999) Long QT syndrome-associated mutations in the Per-Arnt-Sim (PAS) domain of HERG potassium channels accelerate channel deactivation. *J. Biol. Chem.* **274**: 10113–10118
- Chen P & Priori SG (2008) The Brugada syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol.* **51**: 1176–1180
- Chen X, Bonne S, Hatzfeld M, van Roy F & Green KJ (2002) Protein binding and functional characterization of plakophilin 2. Evidence for its diverse roles in desmosomes and beta -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* **277**: 10512–10522
- Choe S (2002) Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**: 115–121
- Cordes FS, Bright JN, Sansom MSP (2002) Proline-induced Distortions of Transmembrane Helices. *J. Mol. Biol.* **323**: 951–960
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI & McDonald TV (2000) Cyclic AMP regulates the HERG K(+) channel by dual pathways. *Curr. Biol.* **10**: 671–674
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED & Keating MT (1995) A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**: 795–803

- Dalal D, Molin LH, Piccini J, Tichnell C, James C, Bomma C, Prakasa K, Towbin JA, Marcus FI, Spevak PJ, Bluemke DA, Abraham T, Russell SD, Calkins H & Judge DP (2006) Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2. *Circulation* **113**: 1641–1649
- Decher N, Renigunta V, Zuzarte M, Soom M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC & Splawski I (2007) Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: a novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovasc. Res.* **75**: 748–757
- den Haan AD, Tan BY, Zikusoka MN, Lladó LI, Jain R, Daly A, Tichnell C, James C, Amat-Alarcon N, Abraham T, Russell SD, Bluemke DA, Calkins H, Dalal D & Judge DP (2009) Comprehensive desmosome mutation analysis in north americans with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* **2**: 428–435
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT & Mackinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **280**: 69–77
- Du GG, Khanna VK & MacLennan DH (2000) Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca(2+) sensitivity of the skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor). *J. Biol. Chem.* **275**: 11778–11783
- Eckardt L. & Haverkamp W (2007) Ionenkanalerkrankungen: vom EKG bis zur genetischen Diagnostik: Wie weit muss man gehen? *Der Kardiologe* **1**: 283–296
- El-Sherif N & Turitto G (2003) Torsade de pointes. *Curr. Opin. Cardiol.* **18**: 6–13
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E & Borggrefe M (2003) Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* **108**: 965–970
- Garrod D & Chidgey M (2008) Desmosome structure, composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**: 572–587
- Gellens ME, George AL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL & Kallen RG (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 554–558
- George AL, Varkony TA, Drabkin HA, Han J, Knops JF, Finley WH, Brown GB, Ward DC & Haas M (1995) Assignment of the human heart tetrodotoxin-resistant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel alpha-subunit gene (SCN5A) to band



- 3p21. *Cytogenet. Cell Genet.* **68**: 67–70
- George CH, Jundi H, Thomas NL, Fry DL & Lai FA (2007) Ryanodine receptors and ventricular arrhythmias: emerging trends in mutations, mechanisms and therapies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**: 34–50
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Drenckhahn J, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E & Thierfelder L (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat. Genet.* **36**: 1162–1164
- Getsios S, Huen AC & Green KJ (2004) Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 271–281
- Giannini G, Conti A, Mammarella S, Scrobogna M & Sorrentino V (1995) The ryanodine receptor/calcium channel genes are widely and differentially expressed in murine brain and peripheral tissues. *J. Cell Biol.* **128**: 893–904
- Gradaus, Rainer; Block, Michael; Brachmann, Johannes; Breithardt, Günter; Huber, Hans G.; Jung, Werner; Kranig, Wolfgang; Mletzko, Ralph U.; Schoels, Wolfgang; Seidl, Karlheinz; Senges, Jochen; Siebels, Jürgen; Steinbeck, Gerhard; Stellbrink, Christoph; Andresen, Dietrich (2003) *ICD-Therapie bei Kindern: Überlebensvorteil oder doch nur Komplikationen ?* [http://www.dgk.org/kongresse/ft/ft2003/presstexte/0301\\_03\\_006.pdf](http://www.dgk.org/kongresse/ft/ft2003/presstexte/0301_03_006.pdf). 10 March 2011
- Grant AO (2001) Molecular biology of sodium channels and their role in cardiac arrhythmias. *Am. J. Med.* **110**: 296–305
- Green KJ & Gaudry CA (2000) Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 208–216
- Groenewegen WA, Bezzina CR, van Tintelen JP, Hoorntje TM, Mannens MMAM, Wilde AAM, Jongsma HJ & Rook MB (2003) A novel LQT3 mutation implicates the human cardiac sodium channel domain IVS6 in inactivation kinetics. *Cardiovasc. Res.* **57**: 1072–1078
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR & Bjerregaard P (2000) Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* **94**: 99–102
- Hamilton SL & Serysheva II (2009) Ryanodine receptor structure: progress and challenges. *J. Biol. Chem.* **284**: 4047–4051

- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A & Shah R (2000) The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* **47**: 219–233
- Haverkamp W, Wichter T, Chen X, Hördt M, Willems S, Rotman B, Hindricks G, Kottkamp H, Borggrefe M & Breithardt G (1994) [The pro-arrhythmic effects of anti-arrhythmia agents]. *Z Kardiol* **83 Suppl 5**: 75–85
- Haverkamp W, Rolf S, Osterziel K, Dietz R & Peters S (2005) [Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy]. *Herz* **30**: 565–570
- Hedley PL, Jørgensen P, Schlamowitz S, Wangari R, Moolman-Smook J, Brink PA, Kanters JK, Corfield VA & Christiansen M (2009) The genetic basis of long QT and short QT syndromes: a mutation update. *Hum. Mutat.* **30**: 1486–1511
- Herren T, Gerber PA & Duru F (2009) Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a not so rare "disease of the desmosome" with multiple clinical presentations. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* **98**: 141–158
- Herzberg IM, Trudeau MC & Robertson GA (1998) Transfer of rapid inactivation and sensitivity to the class III antiarrhythmic drug E-4031 from HERG to M-eag channels. *J. Physiol. (Lond.)* **511 ( Pt 1)**: 3–14
- Hodgkin AL & Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (Lond.)* **117**: 500–544
- Huber AH, Nelson WJ & Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90**: 871–882
- Huikuri HV, Castellanos A & Myerburg RJ (2001) Sudden death due to cardiac arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1473–1482
- Hwang HW, Chen JJ, Lin YJ, Shieh RC, Lee MT, Hung SI, Wu JY, Chen YT, Niu DM & Hwang BT (2005) R1193Q of SCN5A, a Brugada and long QT mutation, is a common polymorphism in Han Chinese. *J. Med. Genet.* **42**: e7; author reply e8
- Ingles J & Semsarian C (2007) Sudden cardiac death in the young: a clinical genetic approach. *Intern Med J* **37**: 32–37
- January CT, Gong Q & Zhou Z (2000) Long QT syndrome: cellular basis and arrhythmia mechanism in LQT2. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **11**: 1413–

1418

- Kagan A, Melman YF, Krumerman A & McDonald TV (2002) 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K<sup>+</sup> channel activity. *EMBO J.* **21**: 1889–1898
- Karschin C & Karschin A (1997) Ontogeny of gene expression of Kir channel subunits in the rat. *Mol. Cell. Neurosci.* **10**: 131–148
- Kass RS (2006) Sodium channel inactivation in heart: a novel role of the carboxy-terminal domain. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **17 Suppl 1**: S21-S25
- Kaufertstein S, Kiehne N, Neumann T, Pitschner H & Bratzke H (2009) Cardiac gene defects can cause sudden cardiac death in young people. *Dtsch Arztebl Int* **106**: 41–47
- Kellenberger S, Scheuer T & Catterall WA (1996) Movement of the Na<sup>+</sup> channel inactivation gate during inactivation. *J. Biol. Chem.* **271**: 30971–30979
- Kirchhof PBG (2003) Molekulare Mechanismen des plötzlichen Herztodes und ihre klinische Bedeutung. *Herzschr Elektrophys (Herzschrittmacher und Elektrophysiologie)* **14**: 168–179
- Kirchhof P, Breithardt G & Eckardt L (2006) Primary prevention of sudden cardiac death. *Heart* **92**: 1873–1878
- Koch PJ, Walsh MJ, Schmelz M, Goldschmidt MD, Zimbelmann R & Franke WW (1990) Identification of desmoglein, a constitutive desmosomal glycoprotein, as a member of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Eur. J. Cell Biol.* **53**: 1–12
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN & Jan LY (1993) Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* **362**: 127–133
- Lerche H. MNJKLF (2000) Ionenkanalerkrankungen: Allgemeine Charakteristika und Pathomechanismen. *Dtsch Arztebl (Deutsches Ärzteblatt)* **97**: 1826–1831
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggenmann A, Kummer W, Veh RW, Daut J & Preisig-Müller R (2001) Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K<sup>+</sup> channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **532**: 115–126
- Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Robinson JL, Andrews M, Timothy K & Hall WJ (1998) Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International

- LQTS Registry. *Circulation* **97**: 2237–2244
- Lopatin AN & Nichols CG (2001) Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: 625–638
- MacKinnon R (2004) Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**: 4265–4277
- Mank-Seymour AR, Richmond JL, Wood LS, Reynolds JM, Fan Y, Warnes GR, Milos PM & Thompson JF (2006) Association of torsades de pointes with novel and known single nucleotide polymorphisms in long QT syndrome genes. *Am. Heart J.* **152**: 1116–1122
- Marbán E (2002) Cardiac channelopathies. *Nature* **415**: 213–218
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N & Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**: 365–376
- Medeiros-Domingo A, Bhuiyan ZA, Tester DJ, Hofman N, Bikker H, van Tintelen JP, Mannens MMAM, Wilde AAM & Ackerman MJ (2009) The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**: 2065–2074
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC & Ackerman MJ (2007) SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**: 134–142
- Meissner G (2004) Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* **35**: 621–628
- Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Sepehri Chong S, Schnölzer M & Franke WW (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 7795–7800
- Mertens C, Kuhn C & Franke WW (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *J. Cell Biol.* **135**: 1009–1025
- Modell SM & Lehmann MH (2006) The long QT syndrome family of cardiac ion channelopathies: a HuGE review. *Genet. Med.* **8**: 143–155

- Mohler PJ, Rivolta I, Napolitano C, LeMaillet G, Lambert S, Priori SG & Bennett V (2004) Nav1.5 E1053K mutation causing Brugada syndrome blocks binding to ankyrin-G and expression of Nav1.5 on the surface of cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 17533–17538
- Mohler PJ, Schott J, Gramolini AO, Dilly KW, Guatimosim S, duBell WH, Song L, Haurogné K, Kyndt F, Ali ME, Rogers TB, Lederer WJ, Escande D, Le Marec H & Bennett V (2003) Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**: 634–639
- Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M & Mackinnon R (1998) Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**: 649–655
- Mori M, Konno T, Ozawa T, Murata M, Imoto K & Nagayama K (2000) Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca<sup>2+</sup>-sensitivity? *Biochemistry* **39**: 1316–1323
- Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weiskamp L, Vincent GM & Garson A (1991) The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* **84**: 1136–1144
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y & Minamino N (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121–127
- Ogawa Y (1994) Role of ryanodine receptors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**: 229–274
- Pandini A & Bonati L (2005) Conservation and specialization in PAS domain dynamics. *Protein Eng. Des. Sel.* **18**: 127–137
- Paul M, Zumhagen S, Stallmeyer B, Koopmann M, Spieker T & Schulze-Bahr E (2009) Genes causing inherited forms of cardiomyopathies. A current compendium. *Herz* **34**: 98–109
- Paulussen A, Raes A, Matthijs G, Snyders DJ, Cohen N & Aerssens J (2002) A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency. *J. Biol. Chem.* **277**: 48610–48616
- Pellequer JL, Wager-Smith KA, Kay SA & Getzoff ED (1998) Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 5884–5890

- Pérez-García MT, Chiamvimonvat N, Marban E & Tomaselli GF (1996) Structure of the sodium channel pore revealed by serial cysteine mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 300–304
- Phrommintikul A & Chattipakorn N (2006) Roles of cardiac ryanodine receptor in heart failure and sudden cardiac death. *Int. J. Cardiol.* **112**: 142–152
- Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA & Rampazzo A (2006) Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circulation* **113**: 1171–1179
- Posch MG, Posch MJ, Geier C, Erdmann B, Mueller W, Richter A, Ruppert V, Pankuweit S, Maisch B, Perrot A, Buttgerit J, Dietz R, Haverkamp W & Ozcelik C A missense variant in desmoglein-2 predisposes to dilated cardiomyopathy. *Mol. Genet. Metab.* **95**: 74–80
- Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW & Daut J (2002) *Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome*. February 2011
- Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA & Wilde A (1999) Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias; impact on clinical management. Study group on molecular basis of arrhythmias of the working group on arrhythmias of the european society of cardiology. *Eur. Heart J.* **20**: 174–195
- Priori SG, Napolitano C, Gasparini M, Pappone C, Della Bella P, Brignole M, Giordano U, Giovannini T, Menozzi C, Bloise R, Crotti L, Terreni L & Schwartz PJ (2000) Clinical and genetic heterogeneity of right bundle branch block and ST-segment elevation syndrome: A prospective evaluation of 52 families. *Circulation* **102**: 2509–2515
- Raab-Graham KF, Radeke CM & Vandenberg CA (1994) Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* **5**: 2501–2505
- Rampazzo A, Nava A, Malacrida S, Beffagna G, Bauce B, Rossi V, Zimbello R, Simionati B, Basso C, Thiene G, Towbin JA & Danieli GA (2002) Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **71**: 1200–1206

- Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL & Strauss HC (1995) C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K<sup>+</sup> channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* **489** ( Pt 3): 709–721
- Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV & Strauss HC (1998) Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. *Circ. Res.* **82**: 739–750
- Rivolta I, Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Priori SG & Kass RS (2002) A novel SCN5A mutation associated with long QT-3: altered inactivation kinetics and channel dysfunction. *Physiol. Genomics* **10**: 191–197
- Roden DM & George AL (1997) Structure and function of cardiac sodium and potassium channels. *Am. J. Physiol.* **273**: H511-25
- Roden DM, George AL & Bennett PB (1995) Recent advances in understanding the molecular mechanisms of the long QT syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **6**:1023–1031
- Roden DM, Balser JR, George AL & Anderson ME (2002) Cardiac ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 431–475
- Rolf S, Bruns HJ, Wichter T, Kirchhof P, Ribbing M, Wasmer K, Paul M, Breithardt G, Haverkamp W, Eckhardt L (2003) The ajmaline challenge in Brugada syndrome: Diagnostic impact, safety, and recommended protocol. *Eur Heart J* **24**:1104-1112
- Romano C, Gemme G & Pongiglione R (1963) [Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age II. Syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation]. *Clin Pediatr (Bologna)* **45**: 656–683
- Ruan Y, Liu N & Priori SG (2009) Sodium channel mutations and arrhythmias. *Nat Rev Cardiol* **6**: 337–348
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491
- Schimpf R, Kuschyk J, Veltmann C, Borggrefe M & Wolpert C (2005) [Primary electrical heart disease in adulthood--electrophysiological findings and therapy]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* **16**: 250–259
- Schimpf R, Borggrefe M & Wolpert C (2008) Clinical and molecular genetics of the short QT syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* **23**: 192–198
- Schimpf R, Veltmann C, Wolpert C & Borggrefe M (2009) Channelopathies: Brugada syndrome, long QT syndrome, short QT syndrome, and CPVT.

*Herz* **34**: 281–288

- Schönherr R & Heinemann SH (1996) Molecular determinants for activation and inactivation of HERG, a human inward rectifier potassium channel. *J. Physiol. (Lond.)* **493 ( Pt 3)**: 635–642
- Schulze-Bahr E (2005) [Primary electrical heart diseases]. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* **16**: 225–228
- Schulze-Bahr E, Haverkamp W, Wedekind H, Rubie C, Hördt M, Borggrefe M, Assmann G, Breithardt G & Funke H (1997a) Autosomal recessive long-QT syndrome (Jervell Lange-Nielsen syndrome) is genetically heterogeneous. *Hum. Genet.* **100**: 573–576
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hördt M, Towbin JA, Borggrefe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C & Funke H (1997b) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet.* **17**: 267–268
- Schwartz PJ & Malliani A (1975) Electrical alternation of the T-wave: clinical and experimental evidence of its relationship with the sympathetic nervous system and with the long Q-T syndrome. *Am. Heart J.* **89**: 45–50
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR & Bloise R (2000) A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* **343**: 262–267
- Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V & Wattanasirichaigoon D et al (2001) Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**: 89–95
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K, Shkolnikova M, Berul CI, Bitner-Glindzicz M, Toivonen L, Horie M, Schulze-Bahr E & Denjoy I (2006) The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation* **113**: 783–790
- Sen-Chowdhry S, Syrris P & McKenna WJ (2005) Genetics of right ventricular cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **16**: 927–935
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP & Gopalakrishnan M (2000) Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol. Rev.* **52**: 557–594



- Smits JPP, Eckhardt L, Probst V, Bezzina CR, Schott JJ, Remme CA, Haverkamp W, Breithardt G, Escande D, Schulze-Bahr E, LeMarec H, Wilde AAM (2002) Genotype-Phenotype Relationship in Brugada Syndrome: Electrocardiographic Features Differentiate *SCN5A*-Related Patients From Non-*SCN5A*-Related Patients. *JACC* **40** (2): 350-359
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM & Keating MT (2000) Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. *KVLQT1*, *HERG*, *SCN5A*, *KCNE1*, and *KCNE2*. *Circulation* **102**: 1178–1185
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH & Keating MT (1998) Genomic structure of three long QT syndrome genes: *KVLQT1*, *HERG*, and *KCNE1*. *Genomics* **51**: 86–97
- Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC & Keating MT (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 8089-96
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H & Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**: 597–603
- Syrris P, Ward D, Asimaki A, Evans A, Sen-Chowdhry S, Hughes SE & McKenna WJ (2007) Desmoglein-2 mutations in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a genotype-phenotype characterization of familial disease. *Eur. Heart J.* **28**: 581–588
- Takahata T, Yasui-Furukori N, Sasaki S, Igarashi T, Okumura K, Munakata A & Tateishi T (2003) Nucleotide changes in the translated region of *SCN5A* from Japanese patients with Brugada syndrome and control subjects. *Life Sci.* **72**: 2391–2399
- Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M & Hirose T (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **339**: 439–445
- Tan HL, Hofman N, van Langen IM, van der Wal AC & Wilde AAM (2005) Sudden unexplained death: heritability and diagnostic yield of cardiological and genetic examination in surviving relatives. *Circulation* **112**: 207–213
- Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AAM,

- Anderson ME & Balser JR (2002) A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* **415**: 442–447
- Tester DJ & Ackerman MJ (2006) The role of molecular autopsy in unexplained sudden cardiac death. *Curr. Opin. Cardiol.* **21**: 166–172
- Tester DJ & Ackerman MJ (2007) Postmortem long QT syndrome genetic testing for sudden unexplained death in the young. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**: 240–246
- Tester DJ & Ackerman MJ (2008) Novel gene and mutation discovery in congenital long QT syndrome: let's keep looking where the street lamp standeth. *Heart Rhythm* **5**: 1282–1284
- Tester DJ & Ackerman MJ (2009) Cardiomyopathic and channelopathic causes of sudden unexplained death in infants and children. *Annu. Rev. Med.* **60**: 69–84
- Thomas D, Zhang W, Karle CA, Kathöfer S, Schöls W, Kübler W & Kiehn J (1999) Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **274**: 27457–27462
- Tiso N, Stephan DA, Nava A, Bagattin A, Devaney JM, Stanchi F, Larderet G, Brahmbhatt B, Brown K, Bauce B, Muriago M, Basso C, Thiene G, Danieli GA & Rampazzo A (2001) Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2). *Hum. Mol. Genet.* **10**: 189–194
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu Y, Ptacek LJ & Tawil R (2002) Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J. Clin. Invest.* **110**: 381–388
- Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ & Makielski JC (2008) Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 9355–9360
- Vatta M, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ & Towbin JA (2006) Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* **114**: 2104–2112

- Vatta M, Dumaine R, Varghese G, Richard TA, Shimizu W, Aihara N, Nademanee K, Brugada R, Brugada J, Veerakul G, Li H, Bowles NE, Brugada P, Antzelevitch C & Towbin JA (2002) Genetic and biophysical basis of sudden unexplained nocturnal death syndrome (SUNDS), a disease allelic to Brugada syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 337–345
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L & Skupski M et al (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304–1351
- Vilin YY, Makita N, George AL & Ruben PC (1999) Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys. J.* **77**: 1384–1393
- Viswanathan PC, Benson DW & Balser JR (2003) A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *J. Clin. Invest.* **111**: 341–346
- Wang Q, Chen S, Chen Q, Wan X, Shen J, Hoeltge GA, Timur AA, Keating MT & Kirsch GE (2004) The common SCN5A mutation R1193Q causes LQTS-type electrophysiological alterations of the cardiac sodium channel. *J. Med. Genet.* **41**: e66
- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Jager T de, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD & Keating MT (1996) Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat. Genet.* **12**: 17–23
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA & Keating MT (1995) SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**: 805–811
- Wang R, Zhong X, Meng X, Koop A, Tian X, Jones PP, Fruen BR, Wagenknecht T, Liu Z & Chen SRW (2011) Localization of the dantrolene binding sequence near the FKBP binding site in the three-dimensional structure of the ryanodine receptor. *The Journal of biological chemistry*
- Ward OC (1964) A NEW FAMILIAL CARDIAC SYNDROME IN CHILDREN. *J Ir Med Assoc* **54**: 103–106
- Wedekind H, Schulze-Bahr E, Debus V, Breithardt G, Brinkmann B & Bajanowski T (2007) Cardiac arrhythmias and sudden death in infancy: implication for

- the medicolegal investigation. *Int. J. Legal Med.* **121**: 245–257
- Wedekind H. MGBGSE (2003) Der plötzliche Hertod: Genetische Prädispositionen. *Herzschr Elektrophys (Herzschrittmacher und Elektrophysiologie)* **14**: 180–191
- Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, Vest JA, Reiken SR, Mohler PJ, Sun J, Guatimosim S, Song LS, Rosembly N, D'Armiento JM, Napolitano C, Memmi M, Priori SG, Lederer WJ & Marks AR (2003) FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* **113**: 829–840
- West JW, Patton DE, Scheuer T, Wang Y, Goldin AL & Catterall WA (1992) A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na(+)-channel inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10910–10914
- Wichter T. (2009) Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC): Risikostratifikation und Therapie. *Notfall und Rettungsmedizin* **12**: 442–450
- Wichter T. PMBG (2005) Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie: Sportmedizinische Aspekte. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* **56**: 118–125
- Wulff H, Castle NA & Pardo LA (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **8**: 982–1001
- Yamazawa T, Takeshima H, Sakurai T, Endo M & Iino M (1996) Subtype specificity of the ryanodine receptor for Ca<sup>2+</sup> signal amplification in excitation-contraction coupling. *EMBO J.* **15**: 6172–6177
- Yang N & Horn R (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**: 213–218
- Yano M, Yamamoto T, Ikeda Y & Matsuzaki M (2006) Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* **3**: 43–52
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T & Mackinnon R (1991) Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K<sup>+</sup> channel. *Science* **251**: 939–942
- Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Robinson JL, Priori SG, Benhorin J, Locati EH, Towbin JA, Keating MT, Lehmann MH & Hall WJ (1998) Influence of genotype on the clinical course of the long-QT syndrome. International Long-QT Syndrome Registry Research Group. *N. Engl. J.*

*Med.* **339**: 960–965

Zitron E, Scholz EP, Kiesecker C, Pirot M, Kathöfer S, Thomas D, Kiehn J, Katus HA, Becker R & Karle CA (2005) Molecular basis of primary electrical heart diseases. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* **16**: 229–238

Zucchi R & Ronca-Testoni S (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol. Rev.* **49**: 1–51

## 7 Anhang

### 7.1 Mutagenese Primer

SCN5A	I1768V	hin	5'-CGT GGT CAA CAT GTA CGT TGC CAT CA-3'
		rück	5'-CTC CAG GAT GAT GGC AAC GTA CAT GT-3'
	H558R	hin	5'-GGA GAG CGA GAG CCA CCG CAC ATC AC-3'
		rück	5'-CAC CAG CAG TGA TGT GCG GTG GCT CT-3'
	A1186T	hin	5'-GCG GTG GAC ACC ACA CAG ACC CCA GG-3'
		rück	5'-CCA GAC CTT CCC TGG GGT CTG TGT GG-3'
KCNH2	L69P	hin	5'-CCT GCA CCT GCG ACT TCC CGC ACG GG-3'
		rück	5'-GCG TGC GCG GCC CGT GCG GGA AGT CG-3'
	R883W	hin	5'-GAG GGT GGC TTC AGT TGG CAA CGC AA-3'
		rück	5'-CTT GCG CTT GCG TTG CCA ACT GAA GC-3'

Tabelle 7.1: Übersicht über die verwendeten Primer zur Mutagenese.

### 7.2 Vektor pGEM®-T

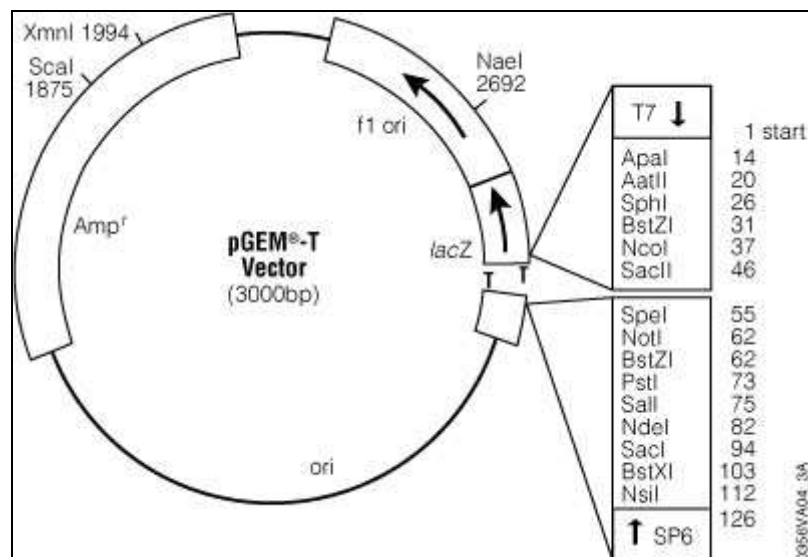


Abb 7.1: Vektorkarte des pGEM T Vektors von Promega (übernommen von Promega.com)

### 7.3 Vektor pSP64

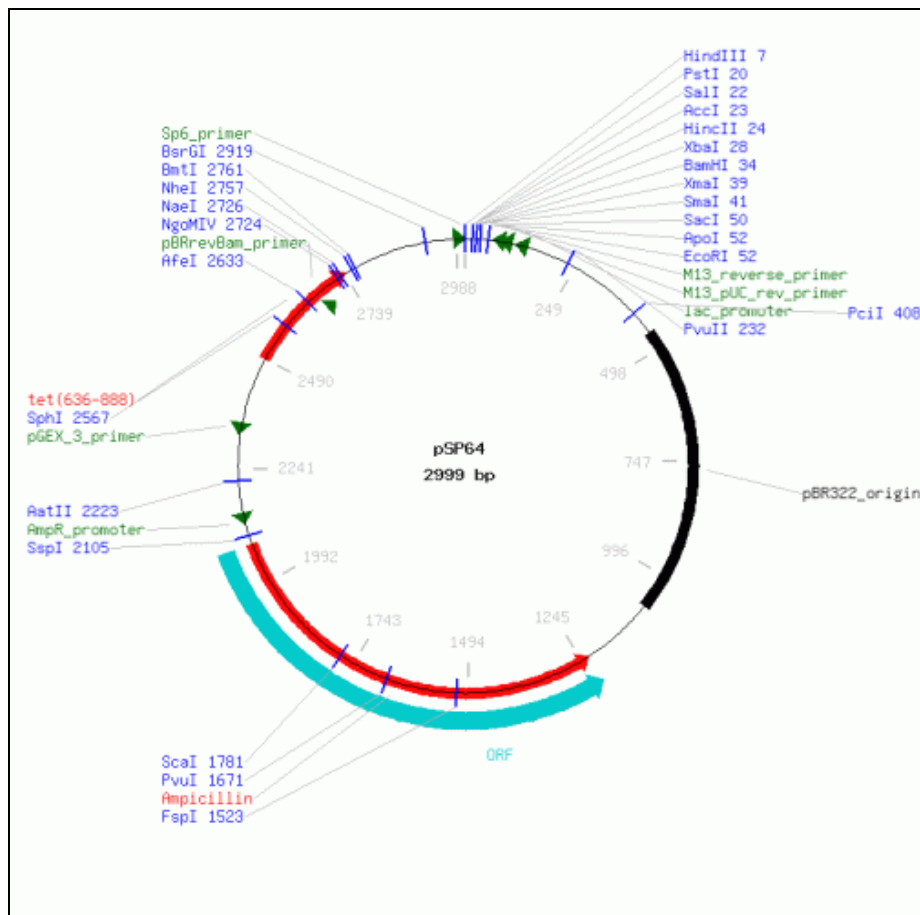


Abb 7.2: Vektorkarte des pSP64 Vektors (übernommen von [www.lablife.org](http://www.lablife.org))

## 8 Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit verschiedenen Instituten durchgeführt. Ohne diese Zusammenarbeit wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen, worüber ich sehr dankbar bin.

In erster Linie möchte ich mich bei **Prof. Dr. Gerhard Thiel** bedanken, der die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat und mich sehr nett in seine Arbeitsgruppe integriert hat.

Gleichermaßen danke ich **Prof. Dr. Dietrich Mebs**, der sich sofort bereit erklärt hat, die externe Betreuung dieser Doktorarbeit im Institut für Rechtsmedizin zu übernehmen und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

**Prof. Ralf Galuske** danke ich für die sofortige Bereitschaft diese Dissertation zu begutachten.

**Prof. Dr. med. Bratzke** danke ich, dass ich in einem sehr gut ausgestatteten Labor arbeiten durfte. Desweiteren bedanke ich mich bei ihm für die Bereitstellung sämtlicher Reagenzien, Geräte und Untersuchungsmaterial.

**Dr. Silke Kauferstein** möchte ich ganz herzlich für die letzten Jahre danken. Sie war mir eine liebe Mentorin, von der ich viel lernen konnte und die sich immer sehr stark für mich eingesetzt hat. Danke!

**PD Dr. med. Thomas Neumann** danke ich für nette Zusammenarbeit und dafür, dass ich mit jeder Frage zu ihm kommen konnte und er mir sehr geduldig medizinische Hintergründe erklärt hat.

**PD Dr. med. Markus Parzeller** danke ich für den Kontakt, den er zur Kerckhoff Klinik hergestellt hat, da ohne diesen Kontakt diese Arbeit nicht so ergebnisreich ausgefallen wäre.

Den **Patienten der Kerckhoff Klinik** danke ich für ihre Bereitschaft an dieser Studie teilgenommen zu haben.



Ich danke sehr herzlich **Carola Wiese** und **Svenja Schütt** zum einen für die tatkräftige Unterstützung im Labor und zum anderen für das sehr nette und freundschaftliche Arbeitsklima, was das Arbeiten zu einer Freude haben machen lassen. Bei **Eleonore Baumann** und **Romy Weber** möchte ich mich für die netten Gespräche während den Mittagspausen und für die viele Nerven-Nahrung bedanken. Bei den restlichen **Mitarbeitern des DNA-Labors** möchte ich mich ebenfalls bedanken, da auch sie mich von Anfang an sehr herzlich in den Arbeitskreis aufgenommen haben.

**Dr. Brigitte Hertel** und **Dipl.-Biol. Timo Greiner** danke ich dafür, dass sie mir die Elektrophysiologie nähergebracht haben und mir geduldig alles erklärt und gezeigt haben. Ferner danke ich dem restlichen **Arbeitskreis von Prof. Dr. Thiel** für die nette Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Ein großes Dankeschön gilt auch **Prof. Jan Tytgat** und besonders **Steve Peigneur** für die elektrophysiologischen Messungen und immunohistologischen Versuche, die sie für mich durchgeführt haben.

Meinen beiden Kolleginnen **Dipl.-Biol. Yvonne Kendel** und **Dipl.-Biol. Petra Böhme** möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken. Es waren sehr schöne Jahre, in denen ich mit Euch das Büro und den Arbeitsplatz teilen durfte. Danke für die schönen, lustigen und manchmal auch traurigen und frustrierenden Momente. Eure Unterstützung hat mich immer aufgebaut und über die Jahre seid ihr mir liebe Freundinnen geworden.

Meiner besten Freundin **Elisabeth Charlotte Fleischmann** möchte ich zum einen für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken und zum anderen für Deine Freundschaft und dass Du immer für mich da bist.

Schließlich möchte ich mich bei meiner **Familie**, insbesondere bei meinen **Eltern** für die moralische Unterstützung, Verständnis und Geduld bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt **Alexander Herz**, der mich die letzten Jahre immer und in jeglicher Form unterstützt hat. Der mir in schwierigen Phasen Mut zugesprochen und immer an mich und meine Arbeit geglaubt hat. Danke für alles!

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Nadine Kiehne  
Geburtstag: 28.04.1978  
Geburtsort: Frankfurt am Main  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

---

Seit Okt. 2007: Promotion (Dr. rer. nat)  
Technische Universität Darmstadt  
Fachbereich Biologie

Okt. 2001 bis Aug. 2006: Studium  
Goethe Universität, Frankfurt am Main  
Studiengang Diplom Biologie – Fachrichtung  
„Molekulare Biologie“  
Diplomarbeit im Schwerpunkt Fach Zellbiologie  
Abschluss mit der Note „sehr gut“

Aug. 1998 bis Jun. 2001: Ausbildung  
Ausbildung zur Biologielaborantin  
Fa. Merck KGaA, Darmstadt  
Abschluss mit der Note „gut“

Aug. 1988 bis Jun. 1998: Gymnasium  
Carl-Schurz-Schule, Frankfurt am Main  
Abschluss: Abitur mit der Note 2,6

Aug. 1984 bis Jul. 1988: Grundschule  
Willemerschule, Frankfurt am Main

### Berufliche Erfahrungen

---

Seit 01.09.2006: Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin  
im Zentrum der Rechtsmedizin der  
Johann Wolfgang Goethe Universität,  
Frankfurt am Main, DNA Labor

---

Mai 2005 bis Aug. 2006:	Beschäftigung als Hilfwissenschaftlerin, Zentrum der Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main Im Bereich Forschung
2001 bis Aug. 2001:	befristete Beschäftigung als Biologielaborantin Fa. Merck KGaA, Darmstadt
Aug. 1998 bis Jun. 2001:	Ausbildung zur Biologielaborantin Fa. Merck KGaA, Darmstadt

### Weiterbildungen und Zusatzkenntnisse

---

- WAVE-User Meeting, 09.11.06 - 10.11.06, Düsseldorf, Deutschland
- 27. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 23.02.07 – 24.02.07, Frankfurt am Main
- Englischkurs im Wall Street Institute, 01.03.2007 – 01.03.2009, (Abschluss: CEF B2)
- Weiterbildungskurs „Gentechnikrecht“ zur Projektleitung im S1-Labor, 18.03.10 – 19.03.10

### Teilnahme an Kongressen und Tagungen

---

- 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 20.04.06 – 22.04.06, Mannheim, Deutschland
- 85th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine and DNA in Forensics 2006, 28.09.06 – 30.09.06, Innsbruck, Österreich
- 37. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner, Bidingen 2007 (**Vortrag**)
- DNA in Forensics, Ancona, Italien 27.05.08 – 30.06.08 (**Vortrag und Poster**)
- 16th European Section Meeting of the International Society on Toxinology, Leuven, Belgien 07.09.08 – 10.09.08 (**Poster**)
- 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 08.04.10 – 10.04.10, Mannheim, Deutschland (**Poster**)
- 89. Jahrestagung der Gesellschaft für Rechtsmedizin, 22.09.10 – 25.09.10, Berlin, Deutschland (**Poster**)
- 7<sup>th</sup> International Congress of the Baltic Medico-Legal Association, 11.11.10 - 13.11.10, Helsinki, Finnland (**Vortrag**)

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Darmstadt, den 18.04.2011

---

Dipl.-Biol. Nadine Kiehne

## 11 Eigene Arbeiten

Nadine Kiehne & Silke Kauferstein, "Mutations in the SCN5A gene: Evidence for a link between long QT syndrome and sudden death?"; Forensic Science International: Genetics 1 (2007) 170-174

Silke Kauferstein, Nadine Kiehne, Thomas Neumann, Heinz-Friedrich Pitschner, Hansjürgen Bratzke, "Plötzlicher Herztod bei jungen Menschen durch kardiale Gendefekte"; Deutsches Ärzteblatt, Jg. 106, Heft 4, 23. Januar 2009, 41-47

Silke Kauferstein, Nadine Kiehne, Damir Erkapic, Jörn Schmidt, Christian W. Hamm, Hansjürgen Bratzke, Heinz-Friedrich Pitschner, Malte Kuniss, Thomas Neumann, „A novel mutation in the cardiac ryanodine receptor gene (RyR2) in a patient with an unequivocal LQTS“, Int J Cardiol., 2011 Jan 21;146(2):249-50. Epub 2010 Dec 3.